

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR - INGÉNIEUR

par

Ahmed MANSOUR

SUJET :

**Etude biochimique et microbiologique
du fromage affiné en saumure**

Soutenue publiquement le 14 Décembre 1972 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président : M. C. ALAIS

Examineurs : MM. R. GAY
E. WEBER

UDART ET CLÉMENT

RELIEURS

11, Rue Sainte-Anne

Tél. : 52.80.09 NANCY

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR - INGÉNIEUR

par

Ahmed MANSOUR

SUJET :

**Etude biochimique et microbiologique
du fromage affiné en saumure**

Soutenue publiquement le 14 Décembre 1972 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président : M. C. ALAIS

Examineurs : MM. R. GAY
F. WEBER

THÈSE

UNIVERSITÉ DE NANCY

DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR M. MARADON

Étude histologique et microbienne
des tumeurs cutanées



Imprimé à Paris
chez M. L. L. L.

AVANT-PROPOS

Avec l'aide de notre travail, nous tenons à remercier
Monsieur le Professeur G. ALALA, Président de l'Institut National
de l'Enseignement Supérieur, et Monsieur le Directeur du Centre de Recherche
Scientifique Appliquée, qui nous ont tous deux accueillis en 1986 dans
leur service de recherche, ainsi que l'École Supérieure de Laiterie,
Bordj-Bou-Orja, pour leur accueil. Ils ont permis de nous faire
connaître.

A ma femme, Dalal, en témoignage de ce travail,

A mon fils Ossamah.

Notre reconnaissance s'adresse aussi aux Professeurs
qui nous ont fait l'honneur de faire partie de notre jury. A
Monsieur le Professeur GAT de l'Université de Khartoum, à
Monsieur WISCH, Professeur à l'École de Laiterie, Directeur du
Service de Technologie Laitière, qui nous a donné des facilités pour
nos publications scientifiques.

Nous exprimons notre reconnaissance à toutes celles
et à tous ceux de l'École Supérieure de Laiterie, et nous en remercions
la plus grande partie de nos travaux de recherche, et à nos Collègues
de service de l'Institut Appliqué de l'Université de Khartoum, qui
à leur tour nous ont permis de présenter ce
travail.

AVANT-PROPOS

Avant d'exposer notre travail, nous tenons à remercier Monsieur le Professeur C. ALAIS, Professeur de Chimie Biologique à l'Université de NANCY 1, Directeur du "Groupe de Recherche Biochimie appliquée", qui a bien voulu nous accueillir en 1969 dans son service de recherche, alors à l'Ecole Supérieure de Laiterie. Personnellement, nous ne saurions lui exprimer assez notre reconnaissance pour avoir grandement facilité notre tâche, non seulement en nous prodiguant, au cours de nombreux entretiens, ses conseils, mais encore pour avoir d'une manière si délicate, grâce à son expérience et à son remarquable esprit d'organisation, aplani des difficultés qui se dressaient devant nous au cours de notre travail.

Nos remerciements vont également aux Professeurs qui nous ont fait l'honneur de faire partie de notre Jury, à Monsieur le Professeur GAY de l'Université de NANCY 1 et à Monsieur WEBER, Professeur à l'Ecole de Laiterie, Directeur du Service de Technologie Laitière, qui nous a donné des facilités pour nos fabrications expérimentales.

Nous exprimons notre reconnaissance à toutes celles et à tous ceux de l'Ecole Supérieure de Laiterie, où nous avons effectué la plus grande partie de nos travaux de recherche, et à nos Camarades du service de Biochimie appliquée de l'Université de NANCY 1, qui à des titres divers, ont contribué à nous permettre de présenter ce travail.

ETUDE BIOCHIMIQUE et MICROBIOLOGIQUE
du FROMAGE AFFINE EN SAUMURE.

---o0o---

	<u>Pages</u>
I - <u>INTRODUCTION</u>	4
II - <u>MATERIEL et METHODES</u>	9
2.1. - Fabrication du fromage salé	9
2.2. - Méthodes d'analyse chimique du fromage et de la saumure	11
2.2.1. - Analyse courante (pH, acidité, matière grasse, extrait sec, cendre)	
2.2.2. - Dosage du chlorure de sodium.	
2.2.3. - Teneur en lactose.	
2.2.4. - Dosage du phosphore.	
2.2.5. - Dosage d'autres minéraux (Ca, Mg, K) par spectrophotométrie d'absorption atomique.	
2.2.6. - Dosage des matières azotées des saumures.	
2.3. - Méthodes du contrôle chimique de l'affinage du fromage	16
2.3.1. - Dosage de l'azote soluble à pH 4,4 (N. S.) et de l'azote non protéique (N. P. N.) dans suspension citratée du fromage.	
2.3.2. - Dosage de l'azote du fromage soluble dans l'eau chaude.	
2.3.3. - Accroissement de l'absorption dans l'ultraviolet.	
2.3.4. - Degré de lipolyse.	
2.4. - Méthodes électrophorétiques	18
2.4.1. - Principe.	
2.4.2. - Réactifs.	
2.4.3. - Préparation du gel.	
2.4.4. - Extraction des protéines précipitables des fromages.	
2.4.5. - Migration et révélation.	

2. 5. - Dosage des acides aminés libres	20
2. 5. 1. - Identification par chromatographie sur papier.	
2. 5. 2. - Dosage quantitatif par l'autoanalyseur.	
2. 6. - Analyse microbiologique du fromage et des saumures	23
2. 6. 1. - Préparation de l'échantillon.	
2. 6. 2. - Dénombrement de la flore totale.	
2. 6. 3. - Dénombrement de la flore lactique.	
2. 6. 3. 1. - Streptocoques lactiques.	
2. 6. 3. 2. - Lactobacilles.	
2. 6. 4. - Recherche et dénombrement des bactéries coliformes.	
2. 6. 5. - Dénombrement des levures et des moisissures.	
2. 6. 6. - Identification des levures de la saumure.	
III - <u>RESULTATS</u>	30
3. 1. - Etude biochimique des fromages, rendement.	30
3. 1. 1. - Evolution du fromage dans une saumure peu concentrée.	
3. 1. 2. - Evolution du pH et de l'acidité.	
3. 1. 3. - Evolution de l'humidité et diffusion du sel.	
3. 1. 4. - Contrôle chimique de l'affinage.	
3. 1. 4. 1. - Méthode d'extraction de la matière azotée soluble.	
3. 1. 4. 2. - Corrélation entre la mesure de la densité optique du filtrat et la teneur en azote soluble.	
3. 1. 4. 3. - Evolution de l'azote soluble et de l'azote non protéique.	
3. 1. 5. - Etude électrophorétique des protéines du fromage.	
3. 1. 6. - Identification et dosage des acides aminés libres.	
3. 1. 6. 1. - Identification.	
3. 1. 6. 2. - Dosage quantitatif.	
3. 1. 7. - Evolution de la matière grasse et du degré de lipolyse.	
3. 1. 7. 1. - Matière grasse.	
3. 1. 7. 2. - Lipolyse.	
3. 1. 8. - Evolution des minéraux dans le fromage conservé en saumure.	
3. 1. 9. - Rendement en fromage.	
3. 1. 10. - Appréciation des caractères organoleptiques.	

3.2. - Etude biochimique de la saumure	62
3.2.1. - Evolution du pH et de l'acidité.	
3.2.2. - Evolution du NaCl.	
3.2.3. - Taux des autres minéraux.	
3.2.4. - Evolution de la matière azotée.	
3.2.5. - Identification et dosage des acides aminés libres dans la saumure.	
3.3. - Etude microbiologique	72
3.3.1. - Evolution de la flore totale.	
3.3.2. - Evolution de la flore lactique.	
3.3.3. - Recherche des coliformes.	
3.3.4. - Evolution des levures et des moisissures.	
3.3.5. - Identification des levures survivantes dans la saumure.	
IV - <u>DISCUSSION</u>	82
4.1. - Aspects physico-chimiques.	
4.2. - Equilibres minéraux.	
4.3. - Diffusion du sel.	
4.4. - Aspects biochimiques.	
4.4.1. - Protéolyse.	
4.4.2. - Lipolyse.	
4.5. - Aspects microbiologiques.	
V - <u>CONCLUSION</u>	96
VI - <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	99

I - INTRODUCTION

Au cours des 10 dernières années, des travaux nombreux ont été consacrés aux problèmes que pose le salage. L'importance de cette opération, dans la fabrication des fromages, découle de ses effets multiples et qu'il faut rattacher à trois causes principales :

a - L'hygroscopicité du sel cristallisé et la forte pression osmotique des saumures provoquent un drainage accru du lactosérum contenu dans la pâte. En outre, les changements de concentration saline modifient l'état d'hydratation des protéines. Il en résulte un complément d'égouttage et la formation de la croûte en est facilitée.

b - Le sel modifie fortement le milieu de culture solide que constitue le caillé égoutté ; il provoque une sélection favorable des microorganismes, par suite de l'inhibition d'espèces dangereuses qui ne sont pas halotolérantes. En outre, le sel règle l'activité des enzymes qui concourent à l'affinage et il modifie la solubilité des protéines.

c - Le sel apporte le goût salé et, de plus, il influe sur l'équilibre des substances sapides, particulières à chaque type de fromage.

Il existe, en pratique différentes méthodes de salage.

- 1 - Salage "à sec", par frottement de la surface du fromage moulé avec du sel fin.
- 2 - Salage par incorporation du sel au caillé broyé, avant le moulage.
- 3 - Salage en saumure du fromage moulé.
- 4 - Dissolution de sel dans le lait avant l'emprésurage ou mélange d'eau salée (eau de mer) au lait avant coagulation.

Les méthodes les plus largement employées sont le salage à sec et le salage en saumure. La méthode n° 2 est utilisée pour certains types de fromages à pâte ferme (Cheddar, Cantal...); la méthode n° 4 est limitée à quelques fabrications typiques du bassin méditerranéen (Domiat, Kariché...).

Le salage en saumure se répand de plus en plus. La plupart des fromages pressés, à pâte non broyée, sont salés de cette manière, mais cette méthode s'emploie aussi pour le salage de "pâtes molles" françaises qui étaient autrefois généralement salées à sec. La saumure permet un salage plus régulier, une diminution de la main d'oeuvre et elle facilite la rationalisation des fabrications. En contrepartie, son emploi pose des problèmes assez sérieux de maintien de la qualité, pendant une durée que l'on souhaite la plus longue possible. Les saumures "vieillissent" vite. Le vieillissement chimique, par baisse de la concentration du chlorure de sodium et augmentation de la concentration des constituants du lactosérum a été bien mis en évidence, il y a longtemps, par KEILLING (44), dans le cas des fromages à pâte cuite.

Nous avons déjà passé en revue les travaux consacrés au mécanisme du salage et effectués principalement en Europe de l'Est (66). Citons ici les études intéressantes qui ont été faites par JAKUBOWSKI et REPS (41, 42, 43). Ces auteurs ont cherché à calculer la concentration en sel dans l'extrait sec du fromage "Tilsit" en connaissant la concentration de la saumure, le temps de salage et la surface relative du fromage moulé. Des études comparables ont été poursuivies avec le fromage KachKaval par VUJICIC (90), qui avait pour objectif principal de déterminer le temps du salage pour obtenir une concentration donnée du sel dans le fromage. Malgré ces tentatives intéressantes pour établir des règles qui permettraient de normaliser l'opération du salage il nous paraît difficile de réunir en une formule simple les différents paramètres avec les connaissances dont nous disposons actuellement.

Il existe des types de fromages qui sont non seulement salés, mais aussi conservés et affinés en saumure. Ils sont caractéristiques de la production fromagère des pays méditerranéens et de l'Europe de l'Est. La fabrication traditionnelle du "fromage blanc" syrien (HALLOM, BALADI, ...) a été décrite avec détails (35, 64, 65). En Roumanie, on fabrique le "Telemea", en Grèce le "Feta", en Russie le "Brinza", en Egypte le "Domiat". Ce genre de fromage est fabriqué dans ces pays à une grande échelle industrielle. A titre d'exemple, le fromage bulgare représente 85 % de la production fromagère (81) de ce pays. Le procédé de fabrication peut varier d'un pays à l'autre, ainsi que la composition et les propriétés du fromage, mais dans tous les cas il est affiné en saumure durant une période pouvant aller jusqu'à un an. Ce mode d'affinage particulier s'explique par des conditions climatiques et économiques.

Des recherches assez nombreuses ont été faites, en dehors de la Syrie, en vue de rendre la production plus homogène et de standardiser la composition. Le fromage égyptien "Domiat" a été le plus étudié ces dernières années ; il est caractérisé par le fait qu'il est obtenu par coagulation de lait cru fortement salé. SIRRY et KOSIKOWSKI (82) ont essayé, avec un succès limité, de le fabriquer à partir du lait pasteurisé et du lait traité à l'eau oxygénée et à la catalase. L'effet du traitement thermique sur la qualité et le rendement de ce type de fromage a été aussi étudié par EL SADEK et ABDEL MOTTELEB (29, 30). Les modifications chimiques se produisant en cours du séjour en saumure ont été étudiées par SHARARA (80) ; la teneur en sel très élevée de ce fromage provoque une maturation très lente. HAMDY (39) a récemment proposé l'emploi de l'enzyme coagulant de Mucor miehei en vue d'accélérer la maturation et réduire la perte de poids au cours de la conservation. Avec un fromage russe, également conservé en saumure, AGAGABYAN et coll. (3) ont montré l'influence favorable d'oligo-éléments (Cu, Co ...) ajoutés au lait sur le développement microbien et l'affinage. Plusieurs auteurs ont proposé l'incorporation de protéines de lactosérum dans le lait avant l'emprésurage pour accélérer l'affinage de ce genre de fromage (17,

D'autres auteurs ont recommandé le salage dans une saumure acidifiée ou faite à partir de lactosérum ; de cette manière, la qualité du fromage serait améliorée et, ce qui est intéressant, la concentration en sel pourrait être diminuée, d'après KERIMOV, MEL'NIK et ZIVKOVIC (45, 69, 96).

Les études concernant ce type de saumure, qui est le milieu de conservation et d'affinage pour ce genre de fromage, sont très peu nombreuses. Leur composition chimique influe fortement sur celle du fromage, comme nous l'avons montré précédemment (67). De plus, l'effet du pH et de l'acidité de la saumure sur la qualité du fromage "Brinza" a été mis en évidence par KERIMOV (46).

Par contre, en ce qui concerne les saumures dans lesquelles le fromage ne séjourne qu'un temps court (de 1 h à 72 h), en particulier en France, des études assez nombreuses ont été faites, dans le but d'améliorer leur qualité et de lutter contre leur "vieillessement" ; citons notamment les travaux récents de LACRAMPE et coll. (54), et CENTELEGHE et coll. (16) qui ont étudié les aspects chimiques et microbiologiques du salage en saumure des pâtes molles, VIARD et DEVEAU (89), qui ont discuté les différents procédés proposés pour améliorer la qualité des saumures.

Il est évident que le problème le plus important, dans ce type de fabrication, concerne l'affinage (5, 7, 31). Le but de la première partie de notre étude est de l'aborder en envisageant les facteurs principaux : température de conservation et concentration en saumure. En considérant les possibilités de modernisation du secteur laitier syrien, nous avons, en outre, essayé une nouvelle manière de conserver ce fromage, après emballage selon le procédé "Cryovac".

L'effet des facteurs précédents sur le rendement et la qualité du fromage sera également étudié.

Etant donné qu'il y a une forte relation entre la composition chimique du fromage et celle de la saumure, la variation de la composition de cette dernière sera poursuivie.

En tenant compte du rôle important que peut jouer la flore bactérienne, sur la qualité organoleptique du fromage, et de la saumure, ainsi que sur leur durée de conservation, nous pensons utile de suivre l'évolution des germes totaux, de la flore lactique, et et de contrôler la présence des bactéries coliformes qui peuvent contaminer le fromage au cours de sa conservation prolongée.

Les levures, elles aussi, peuvent être à l'origine d'altérations graves, comme il l'a été montré par GHONIEM (36), dans le cas du fromage "Domiat". En outre, elles jouent un rôle non négligeable sur la formation du goût et de l'odeur ; c'est pourquoi, nous comptons les étudier. Le nombre important des levures, trouvées notamment dans la saumure, nous a amené à faire une étude d'identification des genres halophiles qui se développent dans ce milieu salé.

N. B. - Deux publications préliminaires, concernant ce travail ont paru (67, 68).

II - MATERIEL ET METHODES *

2.1. - Fabrication du fromage salé :

Ce fromage est fait en général à partir de lait cru, de brebis ou de vache. Pour notre étude, nous avons employé une méthode de fabrication qui tient compte des possibilités actuelles de l'industrie, mais en conservant le type de coagulation lente et le traitement en saumure.

Le fromage est fait à partir de lait de vache pasteurisé à 75°C pendant 15 secondes, puis refroidi à 10°C ; sa teneur en matière grasse est standardisée à 35 g/l environ. Le lait est réchauffé à 35°C ; on ajoute 10 g de CaCl_2 et 0,5 l de ferments lactiques (Str. lactis, Str. cremoris, Str. thermophilus, Leuconostoc citrovorum) pour cent litres ; après un repos de 20 minutes, on ajoute 15 ml de présure liquide au 1/10 000ème ; le temps de coagulation se situe entre 60 à 65 minutes.

Le tranchage est fait immédiatement après la coagulation, puis le caillé est laissé au repos 15 minutes afin que la synérèse se poursuive. On transfère à l'aide d'une louche le caillé dans des moules en polyéthylène spécialement faits pour ce genre de fromage (dimensions : 30 x 30 x 15 cm) et garnis d'une toile (Fig. 1). Le caillé est amené sous la presse pendant 16 h, il est retourné plusieurs fois au cours du pressage ; il est ensuite pesé et découpé en morceaux égaux (7 x 7 x 5 cm). Le fromage découpé subit un présalage dans une saumure à 12 % pendant 6 h ; ensuite il est retiré de la saumure et égoutté pendant 24 h. Ainsi le fromage est prêt soit pour la vente à l'état frais, soit pour la conservation en saumure. Dans nos expériences, le fromage frais est partagé en quatre parties : la première est emballée, sous un

* Nous avons décrit avec quelques détails des méthodes d'analyse bien connues en France, mais moins bien connues dans notre Pays.

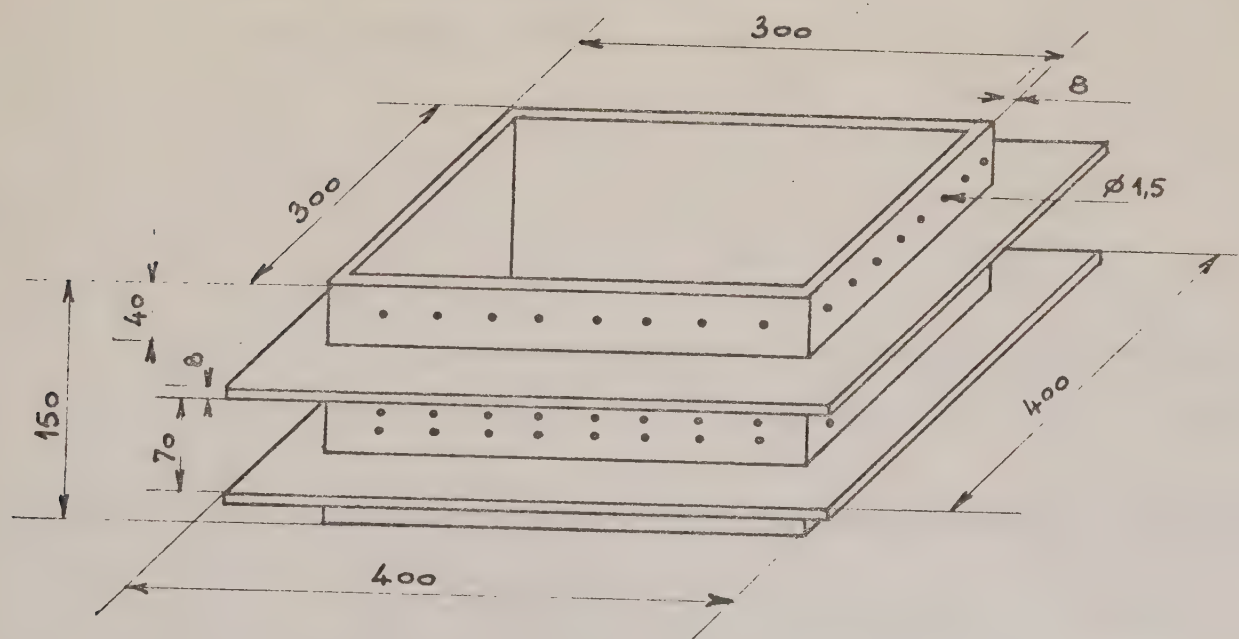
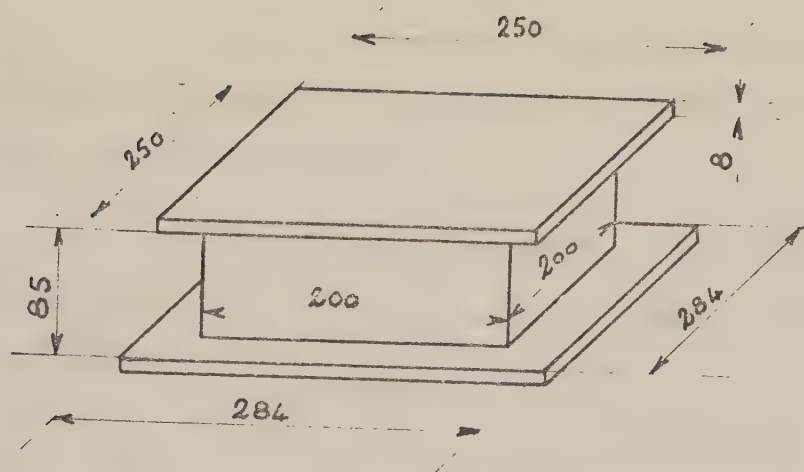
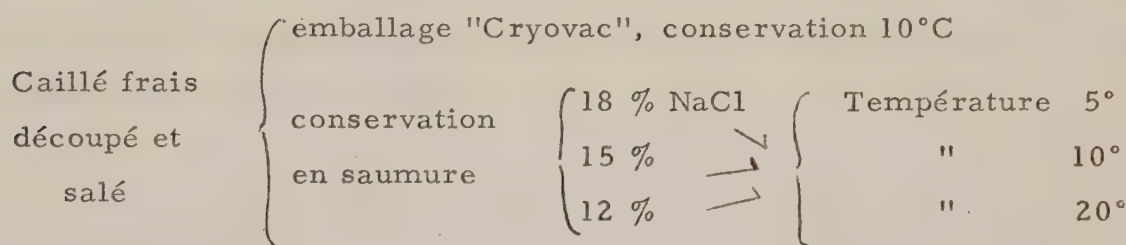


Fig. 1.- Schéma du moule spécial et (au-dessus) du foncet

film plastique, à l'aide d'une plaque chauffante, par le procédé "Cryovac", et conservée comme un fromage ordinaire dans la cave d'affinage à 10-12°C, humidité relative 90 %. Les trois autres parties sont mises dans des bocaux contenant une saumure à 18 %; à 15 % et à 12 %, à raison de 1 Kg de fromage pour 2 litres de saumure.

Ensuite chaque partie est divisée en trois groupes qui sont placés à différentes températures : 5°, 10°, 20°C. Le schéma de répartition est le suivant :



Les saumures sont préparées à partir du sel spécial épuré non traité, fourni par la Compagnie des Salins du MIDI et des Salines de l'Est, dont la composition est la suivante :

H ₂ O %	=	0,025
Sulfates %	=	0,012
Ca %	=	traces
NaCl %	=	99,97

Nous avons fixé la concentration en chlorures de sodium au départ à 120 g, 150 g et 180 g par litre.

2.2. - Méthodes d'analyse chimique du fromage et de la saumure :

Toutes les analyses concernant les fromages sont faites sur des échantillons représentant le fromage entier, sans enlever la croûte, car celle-ci est peu importante et mangeable. Quant aux saumures, elles sont analysées régulièrement au cours de la conservation, après avoir subi une filtration pour éliminer les petits fragments de fromage ; le volume du filtrat obtenu est mesuré.

2.2.1. - Analyses courantes (pH, acidité, matière grasse, extrait sec, cendre).

Le pH est mesuré par un pH-mètre précis au 1/1 000e d'unité, à l'aide d'un électrode combiné. Pour mesurer l'acidité lactique du fromage, nous avons employé la méthode A. O. A. C. (9) : 10 g du fromage sont placés dans une fiole, on ajoute 105 ml d'eau à 40°C, on agite fortement, on filtre ; et ensuite une partie du filtrat est titrée avec la Na OH 0,1 N, en présence du phénolphthaléine. Le résultat est exprimé en acide lactique p. 100 du poids total du fromage.

L'acidité de la saumure est titrée à l'aide de soude N/9. Comme dans le cas du lait ; elle est exprimée en degré Dornic, (1°D est égal à 0,01 % d'acide lactique).

La matière grasse est déterminée par la méthode volumétrique de GERBER, en utilisant le butyromètre de Van GULIK.

L'extrait sec est déterminé par la méthode officielle de la F. I. L. (33), qui est basée sur le séchage d'un poids connu du fromage, mélangé à du sable, à l'étuve à 105°C.

Les cendres sont déterminées de la façon suivante : trois grammes du fromage, dans une capsule, sont séchés dans une étuve à 100°C ; la calcination se fait au four à moufle à environ 500°C jusqu'à obtention de cendres blanches. La température ne doit pas dépasser 550°C, afin d'éviter des pertes de minéraux. On laisse refroidir dans le dessiccateur, on pèse et on calcule les cendres obtenues pour 100 de fromage.

2.2.2. - Dosage du chlorure de sodium :

Nous avons employé la méthode de Charpentier-Vohlard normalisée par la F. I. L. . Le chlorure de sodium est libéré par destruction de la matière organique du fromage par le permanganate de potassium et l'acide nitrique. Les ions chlorure sont dosés par titrage au nitrate d'argent et au thiocyanate d'ammonium.

On pèse dans une fiole d'Erlenmeyer environ 2 g de fromage. On ajoute exactement 25 ml de solution de nitrate d'argent 0,1 N (pour le fromage salé, nous en avons ajouté 50 ml), on agite, et on ajoute 25 ml d'acide nitrique concentré. On chauffe à l'ébullition. On ajoute 15 ml de permanganate à 7,5 % à trois reprises. Ensuite, 100 ml d'eau et 5 ml de sulfate ferrique ammoniacal sont ajoutés et mélangés soigneusement, et enfin l'excès de nitrate d'argent est titré au moyen du thiocyanate 0,1 N. Le taux de sel est calculé et exprimé en p. 100 du poids total.

Les chlorures des saumures sont déterminés de la même manière, après une dilution de 20 fois, en raison de leur forte concentration en sel.

2.2.3. - Teneur en lactose :

Un poids bien déterminé du fromage est dispersé dans de l'eau. Une défécation à l'aide de ferrocyanure de zinc est faite. Après une filtration, on ajoute à une partie du filtrat une solution contenant un complexe cuivrique. On détermine gravimétriquement le précipité d'oxyde cuivreux formé par l'action réductrice du lactose. Le mode opératoire du dosage est appliqué selon la méthode de BERTRAND, normalisée par la F. I. L. (32).

On met 10 g de fromage dans un mortier en porcelaine, on disperse l'échantillon dans l'eau chaude (60 - 70°C), on transvase le contenu du mortier dans un ballon jaugé de 500 ml, on dilue à environ 400 ml. Ensuite, on ajoute 5 ml de la solution de sulfate de zinc à 30 % et 5 ml de la solution de ferrocyanure de potassium à 15 %. On complète à 500 ml avec de l'eau distillée et on filtre. On prélève 25 g de la solution de sulfate de cuivre à 7 % et 25 ml de la solution de tartrate alcalin (35 % de tartrate de sodium - potassium et 10 % d'hydroxyde de sodium), dans un bécher, on chauffe le mélange jusqu'à ébullition. A ce mélange, on ajoute 100 ml du filtrat de l'échantillon et on réchauffe. On transvase tout le contenu dans un creuset filtrant préalablement préparé. Le creuset filtrant contenant le précipité d'oxyde cuivreux est rincé avec de l'eau distillée chaude puis avec de l'alcool et enfin, il est séché pendant

30 minutes à 103°C et pesé. Les données obtenues sont converties à l'aide de tables, en lactose anhydre.

Le lactose de la saumure est dosé par la méthode de BERTRAND appliquée au lait ; mais nous avons doublé la prise d'essai dans le cas des saumures, en raison de leur faible teneur en lactose.

2.2.4. - Dosage du phosphore :

La matière organique du fromage et celle de la saumure sont préalablement détruites par minéralisation en voie humide à l'aide de l'acide sulfurique concentré et en présence de quelques gouttes d'eau oxygénée. Le phosphore libéré sous forme d'orthophosphate inorganique est ensuite dosé par la méthode de FISKE et SUBBAROW, modifiée par BAMMAN (11), et dans laquelle on fait réagir, en milieu réducteur, du molybdate d'ammonium pour former du phosphomolybdate qui est réduit en "bleu de molybdène". On mesure la densité optique en utilisant un spectrophotomètre à 660 nm.

On fait tout d'abord une dispersion de 5 g du fromage à analyser, à l'aide d'un mixer rapide (M. S. E. N° 77 229), dans une solution de citrate trisodique 0,5 M pendant 8 minutes. On passe la suspension dans une fiole de 100 ml. On amène le volume à 100 ml avec la solution de citrate en rinçant les parois du mixer. 2 ml de la suspension fromage-citrate ou 1 ml du filtrat de saumure sont introduits dans un matras de MICRO-KJELDAHL, on ajoute 1 ml H_2SO_4 10 N et quelques gouttes d'eau oxygénée. On porte au bain de sable à 130°C, jusqu'à la décoloration complète (2 h environ) ; après minéralisation, on verse le contenu du matras dans une fiole de 25 ml et on amène le volume à 25 ml avec de l'eau distillée.

A 1 ml de cette solution, on ajoute 0,5 ml de Molybdate d'ammonium à 2,5 %, 0,5 ml de la solution réductrice (*) et 3 ml

(*) Solution réductrice :

0,5 g d'acide 1 amino 2 hydroxy - naphtalène sulfonique 4
 $(C_{10}H_9NO_4S)$.
 + 195 ml $NaHSO_3$ à 15 %
 + 5 ml Na_2SO_3 à 20 %.

d'eau distillée ; on laisse le mélange au repos pour stabiliser la couleur bleue pendant une heure. On mesure la densité optique et on la compare à celles des solutions étalons de phosphate monopotassique (solution stock à 0,0439 g/l, contenant 0,01 g P/l).

2.2.5. - Dosage d'autres minéraux (Ca, Mg, K) par Spectrophotométrie d'absorption atomique.

Une étude bibliographique très intéressante, sur cette méthode du dosage a été faite par LINDEN (58), il conclue qu'elle peut être employée pour doser près de vingt métaux dans les produits alimentaires les plus divers. TURK (87) très récemment a décrit avec assez de détail le principe et les constituants essentiels d'un appareil du spectrophotomètre d'absorption atomique.

Nous avons adapté ce mode de dosage pour nos analyses de la façon suivante :

On place 1 ml de la suspension citratée du fromage (voir plus haut) ou 1 ml de filtrat de saumure dans une fiole de 100 ml, on ajoute 10 ml de chlorure de lantane (La_2O_3 118 g, HCl concentré 250 ml, H_2O quantité suffisante pour compléter à 1 litre), qui joue le rôle tampon spectral (59) ; on complète avec de l'eau distillée à 100 ml.

Cette solution est pulvérisée dans la flamme air-acétylène d'un spectrophotomètre Delta (Jobin-Yvon). La teneur en potassium est déterminée en émission de flamme ; celle du calcium et du magnésium le sont par absorption atomique. On calcule à l'aide d'une gamme étalon de chaque élément, tableau 1. Les résultats sont exprimés en g/par Kg du fromage.

Nous avons déterminé également ces minéraux dans le lait à partir duquel le fromage a été fabriqué, pour nous permettre de connaître le taux retenu de chacun des éléments, dans le produit final, c'est-à-dire dans le fromage conservé pendant 4 mois.

Tableau 1

Gamme étalon des minéraux.

	Solution mère g/litre	Solutions filles mg/litre
Ca	4,99 Ca CO_3	2 - 5 - 10 - 15 et 20
Mg	2,025 Mg SO_4	0,2 - 0,5 - 1 - 1,5 et 2
K	8,9 $\text{K}_2 \text{SO}_4$	2 - 4 - 10 - 16 et 20

2.2.6. - Dosage des matières azotées des saumures :

Elles sont dosées par micro-Kjeldahl. Pour l'azote total, la minéralisation est faite sur 1 ml de saumure en présence de 3 ml d'acide sulfurique concentré. Pour l'azote non protéique, nous avons précipité les matières protéiques en prenant un volume de saumure filtrée et 4 volumes d'acide trichloracétique (TCA) à 15 % : ainsi la concentration finale en TCA est de 12 % et la concentration en Na Cl est réduite à 3 % et 3,6 % ; après filtration, 2 ml de filtrat sont minéralisés comme ci-dessous.

2.3. - Méthodes du contrôle chimique de l'affinage du fromage :

Nous avons mesuré à la fois la protéolyse et la lipolyse. Dans le cas de protéolyse, plusieurs procédés ont été proposés ; nous avons essayé comparativement les suivants...

2.3.1. - Dosage de l'azote soluble à pH 4,4 (N. S.) et de l'azote non protéique (N. P. N.) dans la suspension citratée du fromage :

Cette méthode a été préconisée par plusieurs auteurs (12, 83, 49). L'azote est dosé par micro-Kjeldahl, après minéralisation

en présence d'un catalyseur (sélénium 1 g, sulfate ferreux cristallisé 5 g, sulfate de potassium 32 g). La distillation de l'ammoniaque se fait dans une solution d'acide borique à 10 g/l d'eau contenant 200 ml d'éthanol et 10 ml d'indicateur mixte (vert de bromocrésol 0,0825 g et rouge de méthyle 0,165 g dans 250 ml d'éthanol). Le titrage se fait par l'acide sulfurique 0,01 N.

Nous avons déjà décrit le mode de préparation de la suspension citratée du fromage. Pour doser l'azote total, on prend 1 ml de cette suspension.

Pour l'azote soluble, on prend 20 ml de la suspension de fromage dans un bécher, on ajoute de l'acide chlorhydrique 0,2 N pour amener le pH à 4,4. On complète à 50 ml avec de l'eau, dans une fiole, on filtre ; 2 ml du filtrat sont prélevés pour le dosage en Micro-Kjeldahl.

Pour l'azote non protéique (N. P. N.) on prend 20 ml de la suspension dans une fiole jaugée de 50 ml ; on ajoute de l'acide trichloracétique à 20 % jusqu'à la jauge ; de cette façon, on obtient une concentration finale en TCA de 12 % ; on filtre et on dose le N. P. N. sur 2 ml .

Observations :

- Dans le cas où la matière grasse se sépare au mixage, on prélève sous la couche grasse, et on fait une correction pour tenir compte de son volume (densité 0,92).

- On fait une 2ème correction de volume de précipité pour l'N. S. et le N. P. N. (densité de la protéine 1,33).

- Pour une sorte de fromage donnée, on peut déterminer une fois pour toute la quantité d'HCl à ajouter.

2.3.2. - Dosage de l'azote du fromage soluble dans l'eau chaude :

Cette technique a été décrite par LING (60). On pèse 10 g du fromage dans un petit mortier, on ajoute 70 ml d'eau distillée chaude, on broie, on décante dans une fiole de 200 ml. On continue ainsi jusqu'à obtention de 180 ml de liquide environ. On laisse refroidir

avant de compléter à 200 ml ; on mélange et on filtre. On prélève 20 ml sur lesquels, on détermine l'N. S. par la méthode de Kjeldahl (nous avons utilisé un Micro-dosage).

2.3.3. - Accroissement de l'absorption dans l'Ultraviolet :

Nous avons estimé les substances azotées solubles par la mesure de l'absorption à 274,5 nm, selon VAKALERIS et PRICE (88), en utilisant un spectrophotomètre BECKMAN, DU. L'acide chlorhydrique est ajouté à la suspension du fromage pour précipiter la caséine à pH 4,4 ; ensuite le mélange est filtré sur papier WHATMAN N° 42.

La mesure est effectuée sur une partie du filtrat, après l'avoir dilué deux fois, pour obtenir une lecture située entre 0,3 et 1,0 de densité optique. Le zéro est fait en utilisant une solution acide chlorhydrique-citrate-eau distillée.

2.3.4. - Degré de lipolyse :

Il est déterminé sur la matière grasse obtenue après extraction du fromage, mélangé au double de son poids de sable et à son poids de sulfate de sodium anhydre, par l'éther de pétrole (40 - 60°) dans un appareil B. B. S. d'extraction continue pendant 16 h ; selon les indications de KUZDZAL - SAVOIE et KUZDZAL (52).

Après avoir éliminé le solvant, on détermine le poids de matière grasse obtenu ; on ajoute 50 ml de mélange alcool-éther (50/50) et 1 ml de solution de phénol-phtaléine, on agite bien pour dissoudre la matière grasse, et on titre par une solution de soude 0,1 N.

Le résultat est exprimé, par le nombre de millilitres de soude normale nécessaire pour neutraliser les acides gras libres, dans 100 g de matière grasse du fromage.

2.4. - Méthodes électrophorétiques :

Plusieurs auteurs ont fait des études électrophorétiques sur le fromage, en utilisant le gel de polyacrylamide (8, 56, 73, 13). Pour nos essais, nous avons utilisé le gel d'amidon horizontal et nous avons suivi approximativement la technique de WAKE et BALDWIN (91) en l'appliquant aux protéines du fromage.

2.4.1. - Principe :

Rappelons que l'électrophorèse en gel permet de séparer les constituants d'un mélange de protéines en fonction non seulement de leur charge électrique, mais aussi suivant la taille et la forme des molécules, qui doivent passer à travers le gel, fonctionnant comme un tamis moléculaire.

2.4.2. - Réactifs :

- Tampon TRIS, pH 8,6 - 0,76 M le pH est ajusté avec l'acide citrique.
- Tampon acide borique pH 8,6 : acide borique 0,3 M ajusté au pH par la soude concentrée.
- Solution colorante : noir amide à 5 % dans le mélange : méthanol, acide acétique et eau (5 : 1 : 5 vol.).
- Solution décolorante : méthanol, acide acétique, glycérol et eau (5 : 1 : 1 : 5 vol.).

2.4.3. - Préparation du gel :

On ajoute 25,67 g d'amidon soluble, dans un bécher de 500 ml, à 115,35 ml d'eau et 19,7 ml tampon TRIS. On agite en chauffant légèrement sur une flamme douce, quand le gel devient transparent, on ajoute 82,75 g d'urée et 0,40 ml de mercaptoéthanol. Ensuite le gel est dégazé sous vide, avec agitation énergique, puis coulé chaud sur une plaque spéciale. Le gel est abandonné au moins 6 h pour solidification.

2.4.4. - Extraction des protéines précipitables des fromages :

Deux grammes de fromage peu affiné, ou 10 g de fromage très affiné, sont mis dans un erlenmeyer ; on ajoute 30 ml d'eau froide et on mélange à l'aide d'un mixer rapide pendant quelques minutes. On élimine la plus grande partie de la matière grasse séparée sous l'action de barattage intense, après cela on amène la suspension à pH 4,6. On centrifuge à 3 000 tours/mn pendant 3 minutes ; le surnageant est rejeté. On reprend le culot avec 5 ml d'urée 7 M pour

dissoudre les caséines, en agitant fortement, ensuite on amène le pH de la solution à 7,0. Dans le pot de la centrifugeuse, on ajoute 20 ml de tétrachlorure de carbone ; après agitation, on centrifuge de nouveau pour éliminer la matière grasse résiduelle. La solution surnageante obtenue est prête à l'emploi (8).

2.4.5. - Migration et révélation :

A l'aide d'une lame à rasoir, on introduit verticalement dans le gel des petits morceaux de papier Whatman (6 mm x 1 mm) imprégnés du produit à tester. Le gel est recouvert de "parafilm" pour éviter l'évaporation. La plaque est mise sur le dispositif de telle sorte que les deux extrémités soient supportées par le bord interne de chacune des cuves à tampon ; on réalise des ponts gel-tampon en papier Whatman. La migration est effectuée à 4°C, pendant 16 h environ, avec 170 V aux bornes.

Le gel est coupé en tranche, dans l'épaisseur, à l'aide d'un fil de nylon ; on place les tranches dans le bac de colorant pendant 3 à 5 minutes ; ensuite elles sont placées dans la solution décolorante jusqu'à décoloration totale.

Pour conserver les résultats, les tranches sont étalées sur papier Whatman 3 M et laissées sécher à l'air.

2.5. - Dosage des acides aminés libres :

2.5.1. - Identification par chromatographie sur papier :

Nous avons utilisé la chromatographie sur papier à deux dimensions, selon la technique de CONSDE et coll. (19).

Extraction des acides aminés. Elles est réalisée par une dispersion de 5 g du fromage dans 50 ml d'eau bidéminéralisée ; on précipite la caséine, en ajoutant 3 g de TCA, ensuite on centrifuge à 4 000 T/mn, pendant 20 minutes. On filtre sur papier Whatman N° 3(2).

Les filtrats obtenus doivent être exempts de sel pour avoir une excellente chromatographie sur papier. Pour cela, nous avons employé de l'Amberlite IR 120, résine fortement acide. Sur cette résine tous les acides aminés sont fixés, à l'exception de la taurine et peuvent être quantitativement déplacés par l'ammoniaque diluée ; dans ces mêmes conditions les cations minéraux ne sont ^{pas} élués. Au cours des lavages suivant la fixation, les protéines, oses et dérivés lipidiques suivent le sort des eaux de lavage (15).

Le mode opératoire est le suivant : dans un erlenmeyer de 25 ml, on place 2 cm³ de résine sous forme H⁺, 1 ml d'eau distillée et 5 à 10 ml du filtrat du fromage dilué 2 fois pour avoir une solution légèrement acide. L'erlenmeyer est bouché au caoutchouc et agité pendant une heure. On lave ensuite à l'eau distillée plusieurs fois. L'excès d'eau restant est enlevé à l'aide d'une pipette Pasteur. On procède à l'élution avec 1 ml d' NH_4OH 4 N en agitant pendant 15 minutes ; on recueille l'ammoniaque avec une pipette Pasteur ; on lave la résine avec 0.5 ml d' NH_4OH 4 N que l'on recueille de la même façon. Le liquide d'élution obtenu est évaporé sur un verre de montre et le dépôt sec repris par 50 μl environ d'eau distillée, pour exécuter la chromatographie sur papier.

Chromatographie sur papier. Elle est réalisée sur papier Whatman N° 3 MM, à deux dimensions, en méthode descendante. On a utilisé les solvants suivants :

- Butanol, acide acétique, eau (4 : 1 : 5) ; la phase inférieure est utilisée pour la saturation et la phase supérieure pour la chromatographie.

- Phénol, eau (1 : 1) ; la phase inférieure est utilisée pour la chromatographie et la phase supérieure (+ 3 % d'ammoniaque et une pincée de KCN) pour la saturation.

La révélation est faite par la Ninhydrine à 0,25 % dans l'acétone. On sèche les papiers à 100°C pendant quelques minutes.

Nous avons calculé les valeurs R_f des taches développées à la ninhydrine et nous les avons comparées à celles des acides aminés connus, en suivant la même technique.

2. 5. 2. - Dosage quantitatif par l'autoanalyseur :

Principe :

La chromatographie des acides aminés sur colonne est basée essentiellement sur la technique de MOORE et STEIN (72) : les acides aminés sont fixés sur une colonne de résine en polystyrène sulfoné. Tous les acides aminés déposés sont fixés sur la résine par leur groupement NH_3^+ , puis séparés par élution avec différents tampons de pH croissant.

Les acides aminés séparés sont dosés par réaction à la ninhydrine. La coloration violette est lue par un photomètre enregistreur à deux longueurs d'ondes différentes.

Dosage :

Le dosage des acides aminés a été effectué à l'aide d'un Autoanalyseur Technicon TSM 1. L'échantillon (de 20 à 100 μl de filtrat TCA 6 %) additionné de norleucine comme étalon interne, est déposé sur la colonne de résine "Chromobeads". Les acides aminés sont séparés par un gradient discontinu de pH allant de pH 2,75 à pH 5,51. La réaction colorimétrique à la ninhydrine est effectuée automatiquement en flux continu par l'appareil. La coloration est lue par un photomètre enregistreur à deux canaux, l'un à 570 nm pour les acides aminés autres que la proline et un à 440 nm pour la proline.

Les calculs sont effectués en comparaison avec une chromatographie d'une solution étalon d'acides aminés. Les résultats sont donnés en mg par Kg de fromage.

Pour les acides aminés de la saumure, ils sont identifiés par chromatographie sur papier et dosés quantitativement de la même façon que dans le cas du fromage. La saumure est filtrée ; ensuite 6 g de TCA sont dissous dans 100 ml de ce filtrat. On centrifuge et on filtre de nouveau et à partir du filtrat obtenu, on fait l'identification et le dosage.

2.6. - Analyse microbiologique du fromage et de saumures :

L'analyse microbiologique est faite sur le fromage conservé dans une saumure à 18 % du sel à 10°C, et également sur le fromage "Cryovac". Nous avons pensé utile de suivre l'aspect bactériologique de la saumure, parallèlement avec celui du fromage. Pour ce but, nous avons effectué deux fabrications par la méthode que nous avons déjà décrite.

2.6.1. - Préparation de l'échantillon :

Nous avons employé un homogénéisateur mécanique ^{Omni-}type (Sorvall -/Mixer). Dans les pots qui sont déjà stérilisés, on introduit aseptiquement 10 g du fromage et 90 g de la solution stérile de RINGER, diluée au quart. On homogénéise pendant quelques minutes pour avoir une suspension du fromage diluée au 1/10e, prête à analyser.

Pour la saumure, nous avons effectué l'analyse directement sans préparation particulière.

2.6.2. - Dénombrement de la flore totale :

Nous avons appliqué la technique de dilution. Dans des tubes contenant chacun 9 ml de tryptone-sel stérile (tryptone 1 g, Na Cl 8 g, et H₂O distillée 1 000 ml). On réalise une série de dilution, à partir de la suspension du fromage. Deux boîtes de Pétri sont utilisées par échantillon, correspondant chacune à une dilution déterminée, de telle sorte que, sur l'une de ces boîtes au moins, on compte entre 30 et 300 colonies.

Un ml de la dilution retenue est versée au centre de la boîte, puis 12 à 15 ml du milieu gélosé ci-dessous (*), liquéfié au bain-marie bouillant, puis refroidi à 47°C. On mélange et on laisse la gélose se solidifier. Les boîtes sont placées en position renversée à l'étuve à 30°C [±] 1 C, pendant 72 h.

On compte les colonies et on exprime le résultat par le nombre de germes en g de fromage, en tenant compte de la dilution réalisée.

Nous avons suivi la même technique de dénombrement pour la saumure mais le résultat est exprimé par le nombre de germes par ml.

(*) Milieu de culture utilisé : tryptone-Agar-F.I. L. (79), tryptone Difco : 5 g, extrait de levure Difco 2,5 g, glucose 1 g, Agar Difco 15 g, lait écrémé 10 ml, eau distillée 1 000 ml. Ajuster le pH à 7. Stérilisation du milieu à l'autoclave en 15 minutes à 120°C.

2.6.3. - Dénombrement de la flore lactique :

2.6.3.1. - Streptocoques lactiques :

C'est la même technique de dilution que nous avons utilisée pour le dénombrement de germes totaux, mais le milieu de culture utilisé est celui de ELLIKER et coll. (*). Après 3 jours d'incubation à 30°C, on compte les colonies typiques de Str. lactiques, qui se présentent sur le milieu, sous forme de colonies blanchâtres, rondes ou lenticulaires à contours réguliers.

Sur ce milieu qui n'est pas très spécifique, se développent aussi des Lactobacillus et Streptococcus. Cela nous a obligé à faire des colorations au bleu de méthylène et rechercher au microscope pour distinguer entre ces deux groupes lactiques.

(*) Milieu de culture : d'après ELLIKER, ANDERSON et HANNESSON (28). Tryptone 20 g, extrait de levure 5 g, gélatine 2,5 g, glucose 5 g, lactose 5 g, saccharose 5 g, Na Cl 4 g, acétate de Na 1,5 g, acide ascorbique 0,5 g, Agar 15 g, H₂O distillée 1 000 ml, pH 6,8.

2.6.3.2. - Lactobacilles :

La même méthode décrite ci-dessus. Mais nous avons utilisé le milieu (M. R. S.) DEMAN, ROGOSA et SHARPE (23) de la composition suivante :

- Lemco oxoïde ou extrait de viande.... 10 g
- peptone oxoïde ou trypticase BBL.... 10 g
- extrait de levure oxoïde 5 g
- acétate de sodium, à 3 molécules d'eau 5 g

- phosphate dipotassique	2 g
- citrate diammonique	2 g
- Tween 80	1 g
- sels en solution	5 ml
(sulfate de magnésium à 7 molécules d'eau	11,5 g,
sulfate de manganèse à 4 " "	2,8 g
eau distillée " " "	100 ml).
- gélose oxoid	15 g
- eau distillée	1 000 ml.

Ces produits sont dissous dans un ballon placé dans un bain d'eau bouillante, puis ajuster le pH à 6,5. Filtrer et ajouter 20 g du glucose.

On compte les colonies qui apparaissent sous la forme de colonies blanchâtres, à contours réguliers ou irréguliers. Une coloration au bleu de méthylène et une recherche au microscope est nécessaire.

2.6.4. - Recherche et dénombrement des bactéries Coliformes :

Différents milieux de culture peuvent être retenus. Nous avons employé les milieux suivants :

a) Pour la recherche des coliformes, le milieu liquide lactosé aux sels biliaires et au vert brillant (*), la fermentation du lactose produit un dégagement de gaz que l'on peut observer. Les tubes sont ensemencés directement avec le produit et incubés à 31°C pendant 48 h. La présence de dégagement gazeux indique la contamination du produit par les coliformes.

(*) Milieu lactosé biliaire au vert brillant : peptone 10 g, lactose pur 10 g, sels biliaires 16 g, H₂O distillée 1 000 ml, le pH est ajusté à 7. On ajoute 10 ml d'une solution alcoolique de vert brillant à 0,133 %. Après une répartition en tube 160 x 16 à raison de 10 ml, on introduit une cloche de DURHAM par tube.

b) Pour le dénombrement, le milieu au désoxycholate lactose agar (*) est utilisé. La fermentation du lactose provoque le virage de l'indicateur. Les colonies de bactéries coliformes sont colorées en rouge foncé.

(*) Milieu au désoxycholate lactose agar (formule Difco 420) : protéose peptone Difco 10 g, lactose 10 g, désoxycholate de sodium 0,5 g, Na Cl 5 g, citrate de sodium 2 g, agar 15 g, rouge-neutre 0,03 g, H₂O 100 ml. Pour 100 ml de ce milieu, on ajoute 4,25 g de Difco 420.

Pour dénombrer les coliformes, on ensemence les boîtes de Pétri, par la suspension du fromage ou par la saumure. On coule le milieu dans chaque boîte et on incube à 37°C pendant 22-24 h.

2.6.5. - Dénombrement des levures et des moisissures :

Il est fait sur milieu gélosé à la terramycine ou O. G. A. (*). Les boîtes de Pétri sont ensemencées avec 1 ml de la suspension du fromage d'une dilution retenue ou par 1 ml de la saumure diluée. On verse 1 ml de la solution de terramycine à 1 mg/ml. On coule la gélose dans les boîtes, on mélange et on les met à l'incubation à 20 - 25°C pendant 5 jours.

On compte les levures qui se présentent sous forme de colonies rondes plus ou moins bombées ou plates en surface, lenticulaires en profondeur. Les moisissures se présentent sous forme de colonies duveteuses, pigmentées, plus ou moins étendues.

(*) Milieu de culture O. G. A. (79) : glucose 20 g, extrait de levures 5 g, Agar 20 g, H₂O distillée 1 000 ml.

2.6.6. - Identification des levures de la saumure :

Après la dernière numération, sur le milieu O. G. A. gélosé, quelques colonies de types différents sont repiquées sur le milieu Y. M. (Yeast - Malt - extract) de WICKERHAM (94), de la composition suivante : extrait de malt 3 g, extrait de levures 3 g, peptone 5g, glucose 10 g, eau distillée 1 000 ml, le pH est entre 5 et 6.

Après une purification, elles ont été repiquées de nouveau, sur un milieu gélosé dont la composition est la même que ci-dessus avec 2 % de l'agar. Les souches sont conservées à 4°C.

Pour l'identification, nous avons suivi la classification proposée par LODDER et KREEGER VAN RIJ (62).

a) L'étude morphologique est effectuée au microscope sur les cultures de levures ayant incubées 2 à 3 jours à 22°C, en utilisant un bouillon à l'extrait de malt (24) : 15 g de Bacto-Malt extract Broth Difco N° 113 sont dissous dans 1 000 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 4,7.

On mélange sur une lame; une ôse de culture avec une goutte de solution ayant la composition suivante : acide lactique 100 ml, phénol 100 g, glycérol 100 ml, solution saturée d'acide picrique 100 ml (40). On note les formes des cellules, la taille et le mode de la multiplication.

b) Nous avons cherché au microscope, la présence de mycélium, en utilisant une technique de culture sur lame (92). Dans une boîte de Pétri, on place une lame de verre, sur une baguette de verre ; l'ensemble est stérilisé. On coule le milieu de culture (Bacto yeast morphology Agar Difco n° 393), préalablement fondu, dans une boîte de Pétri maintenue à 47°C. On plonge la lame dans ce milieu, on la remet à sa place sur la baguette de verre. Après une solidification du milieu, on inocule les souches en stries sur la lame. Une lamelle stérile est mise sur une partie de strie. On recherche la formation de mycélium après une incubation à 22°C pendant 5 à 7 jours.

c) Aptitude à la sporulation : nous avons utilisé le milieu de GORODKOWA ayant la composition suivante : glucose 0,1 g, peptone 1 g, Na Cl 0,5 g, Agar 1 g, H₂O distillée 100 ml. Ce milieu provoque une sporulation intensive des levures. La formation des spores est recherchée selon la technique de SCHAEFFER et FULTON (78) pendant 1 mois.

d) Croissance en milieu liquide : le bouillon à l'extrait de malt (Bacto Malt Broth Difco N° 113) est utilisé comme milieu de culture. Après une incubation à 25 - 28°C pendant 2 à 3 jours, on examine la formation de pellicule sur la surface de culture, et la présence du sédiment au fond du tube.

e) Croissance sur milieu solide : le milieu gélosé utilisé avait la composition suivante : extrait de malt 30 g, bacto agar 15 g, eau distillée 1 000 ml (Bacto Malt Agar Difco N° 24). Après 2 à 3 jours d'incubation à 25°C, on observe les formes des colonies et la production de pigments.

f) La propriété de fermenter des sucres, en éthanol et gaz carbonique est un caractère très important dans la classification des levures. Nous avons utilisé la technique de LODDER (62).

Le milieu utilisé est composé de 5 g d'extrait de levures dans 1 000 ml d'eau distillée. Après dissolution, le milieu est réparti en tubes de DURHAM avec cloches à gaz, en raison de 9 ml. On stérilise et au moment de l'emploi 1 ml de la solution de sucre à 20 % est ajouté aseptiquement (concentration finale 2 % du sucre). Les solutions de sucres sont stérilisées par filtration sur filtre Seitz E. K. S. Les sucres qui ont été étudiés sont : glucose, galactose, saccharose, maltose et lactose.

Le milieu de culture est inoculé avec 0,1 ml de suspension préparée à partir d'une culture active (1 à 2 jours d'âge) des levures sur le gélose au malt, dans 4,5 ml de l'eau stérilisée. L'incubation est faite à 22 - 25°C pendant 24 - 30 jours ; au cours de cette période, on observe le dégagement gazeux dans la cloche.

g) Pour l'assimilation des sucres, nous avons utilisé la technique auxanographique sur milieu de Bactee Yeast Nitrogen Base Difco N° 392 (24). Ce milieu contient certaines vitamines et oligo-éléments nécessaires à l'assimilation des sucres par certaines levures (94). 6,7 g de ce milieu sont dissous dans 100 ml d'eau distillée, ensuite la solution est stérilisée par filtration sur filtre Seitz E. K. S.

Dans un tube à essai stérile, on mélange 5 ml de gélose à 3 %, préalablement fondue et maintenue à 47°C, 4 ml d'eau distillée et 1 ml de la solution de Yest Nitrogen Base, maintenue à la même température. L'ensemble estensemencé avec 0,1 ml de la suspension de levures préparée comme ci-dessous. Le contenu ci-dessus du tube est coulé dans une boîte de Pétri ayant 60 mm de diamètre. Après un

refroidissement et solidification du milieu, on dépose une pincée du sucre sur la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées à 22°C pendant 5 à 7 jours. On compare la croissance des levures avec le milieu ensemencé de la même manière, mais en absence du sucre. Les sucres étudiés sont : le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose et le lactose.

h) Utilisation des nitrates : l'utilisation ou l'assimilation des nitrates est un caractère très important de la classification des levures. La plupart des genres ne sont pas capables d'assimiler les nitrates, comme *Saccharomyces*, *Pachysolen*, *Pichia*, *Debaryomyces*, par exemple. Par contre, le genre *Hansenula* les utilise.

Le milieu utilisé pour étudier ce caractère est le Bacto Yeast Carbon Base N° 391 (24). 11,7 g de ce milieu sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et additionnés de 0,078 g de nitrate de potassium. Cette solution est stérilisée par filtration sur filtre Seitz E. K. S. On suit la même technique décrite ci-dessus pour l'assimilation des sucres. Un témoin doit être fait de la même façon en absence du nitrate dans le milieu. Après incubation à 22°C pendant 5 à 7 jours, on compare la croissance avec celui des témoins.

III - RESULTATS

3.1. - Etude biochimique des fromages, rendement.

3.1.1. - Evolution du fromage dans une saumure peu concentrée :

Le tableau 2 montre la composition du fromage conservé dans une saumure à 12 % de sel. Dans ces conditions, la conservation de longue durée est pratiquement impossible. Au bout de 15 jours, le fromage a absorbé une grande quantité d'eau et de sel. On voit que l'extrait sec est fortement diminué, de 14, 15 et 17 % respectivement à 20°, 10° et 5°C. Il doit s'agir essentiellement du rétablissement approximatif de l'équilibre osmotique entre la phase aqueuse du fromage présalé et la saumure peu concentrée ; la concentration du sel dans la phase aqueuse du fromage et dans la saumure deviennent comparables.

L'examen organoleptique a montré que le fromage a une texture très modifiée ; il est devenu mou, à la suite d'une absorption très rapide d'eau et de sel. En agitant légèrement les bocaux contenant le fromage, le caillé se disperse dans la saumure. Ce résultat nous a montré que la concentration de 12 % est insuffisante ; de ce fait, nous avons éliminé cette partie de notre étude. Les données qui vont être exposées concernent le fromage emballé sous Cryovac et ceux qui ont été conservés dans les saumures ayant une concentration de 15 à 18 % de sel.

3.1.2. - Evolution du pH et de l'acidité :

Les courbes des figures 2 et 3 montrent qu'au début de la conservation dans la saumure, il se produit une chute rapide de l'acidité et une baisse limitée du pH du fromage. Nous verrons plus loin que l'humidité, dans le même temps, subit une réduction sensible. Il est évident que l'acide lactique ne se concentre pas dans la phase aqueuse

Tableau 2

Composition du fromage conservé
dans la saumure à 12 % de sel.

	Fromage frais	conservé 15 jours		
		à 5°C	10°C	20°C
pH	4,97	4,91	4,88	4,85
Acidité lactique %	0,85	0,78	0,79	0,72
E. S. %	45,5	28,5	30,5	31,6
M. G. % de l'E. S.	50,2	49,3	49,42	49,7
Na Cl %	2,04	5,9	6,2	6,5
N. T. %	3,1	2,35	2,41	2,5
N. S. % N. T.	6,9	7,2	8,9	11,2
N. P. N. % N. T.	4,2	4,5	5,5	7,7

E. S. = extrait sec ;

M. G. = matière grasse ;

N. T. = azote total ;

N. S. = azote soluble ;

N. P. N. = azote non protéique.

du fromage, mais qu'au contraire il y a un passage continu dans la saumure; fait que nous avons vérifié par la suite ; il se peut également qu'une petite partie de l'acide soit détruite par la microflore.

La baisse rapide de l'acidité ne se traduit pas par une élévation du pH ; au contraire, celui-ci baisse légèrement durant les 30 premiers jours, de 0,20 à 0,25 unités. Il y a certainement encore production d'acide lactique (pK 3,85) aux dépens du lactose et il est probable que le pouvoir tampon du milieu a été modifié par le drainage important dans cette période.

Après 30 jours, le pH du fromage remonte lentement, mais régulièrement. L'augmentation est proportionnelle à la température, donc au taux de maturation, comme nous le verrons plus loin. A 5°C, après 120 jours, le pH est inférieur à la valeur de départ, à 10°C, il est approximativement le même. La concentration en sel de la saumure influe légèrement sur la remontée du pH, qui est plus forte à 15 % qu'à 18 %. Par contre, l'acidité du fromage est plus basse avec la saumure à 15 % qu'avec celle à 18 %, à la fin de la conservation ; il se peut que la cause de cet effet soit une plus grande activité microbienne dans le milieu le moins salé. Enfin, dans les deux saumures, l'acidité du fromage dépend de la température ; à 20°C, la flore lactique est évidemment plus active qu'à 10° ou à 5°C.

Dans le fromage emballé selon le procédé "Cryovac", l'évolution de l'acidité est opposée à ce qu'elle est en saumure. Elle croît sensiblement jusqu'au 30ème jour, puis est stable. On remarque que le pH remonte sensiblement après 30 jours, alors que l'acidité ne varie presque plus ; il est possible que ceci soit une conséquence de la dissociation de substances peptidiques libérées au cours de l'affinage.

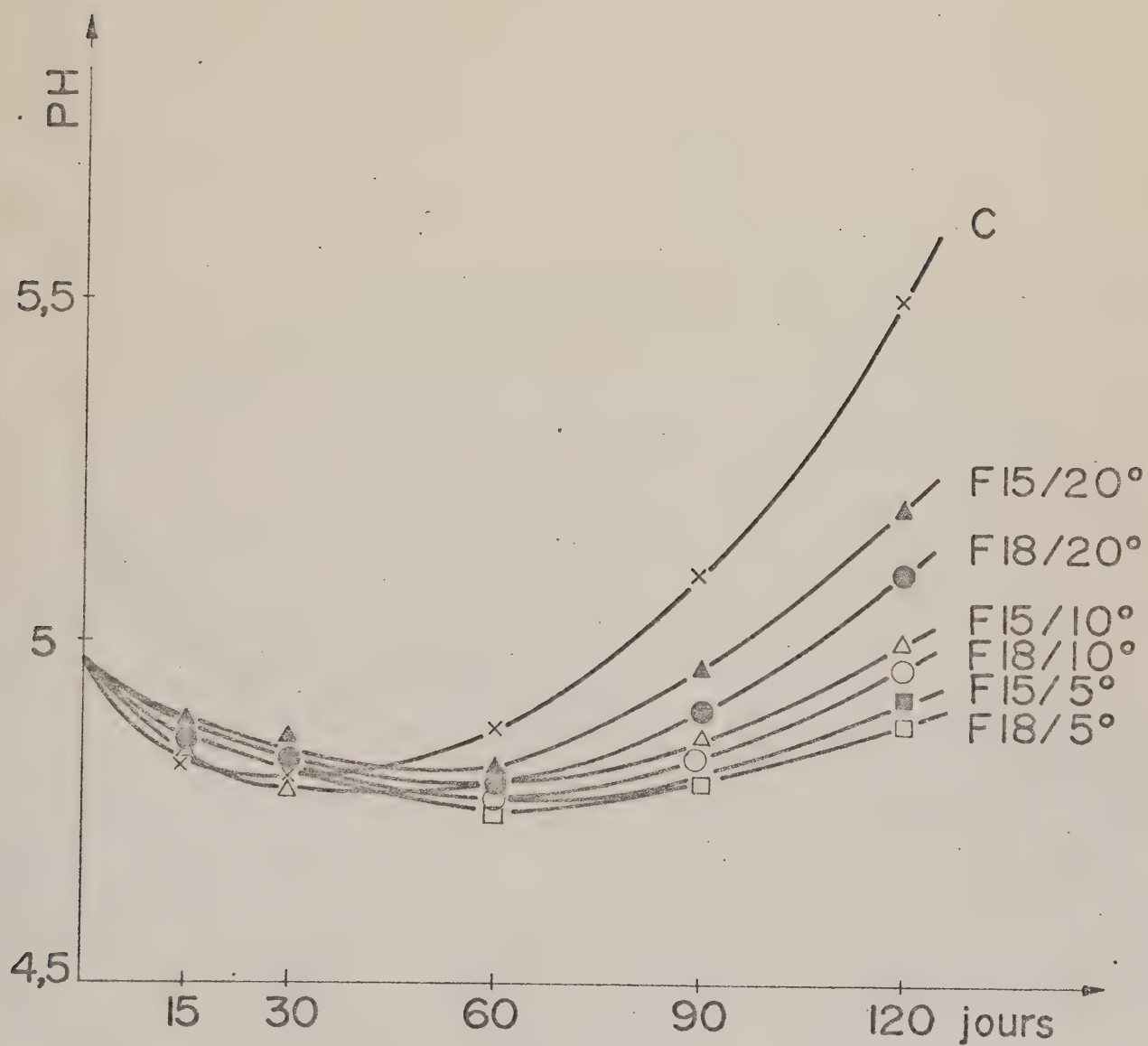


Fig. 2. - Evolution du pH au cours de la conservation :

C : fromage sous "Cryovac" à 10°C ; F 15/20° : fromage dans la saumure à 15 % et à 20°C ; F 18/20° : fromage dans la saumure à 18 % et à 20°C, etc.....

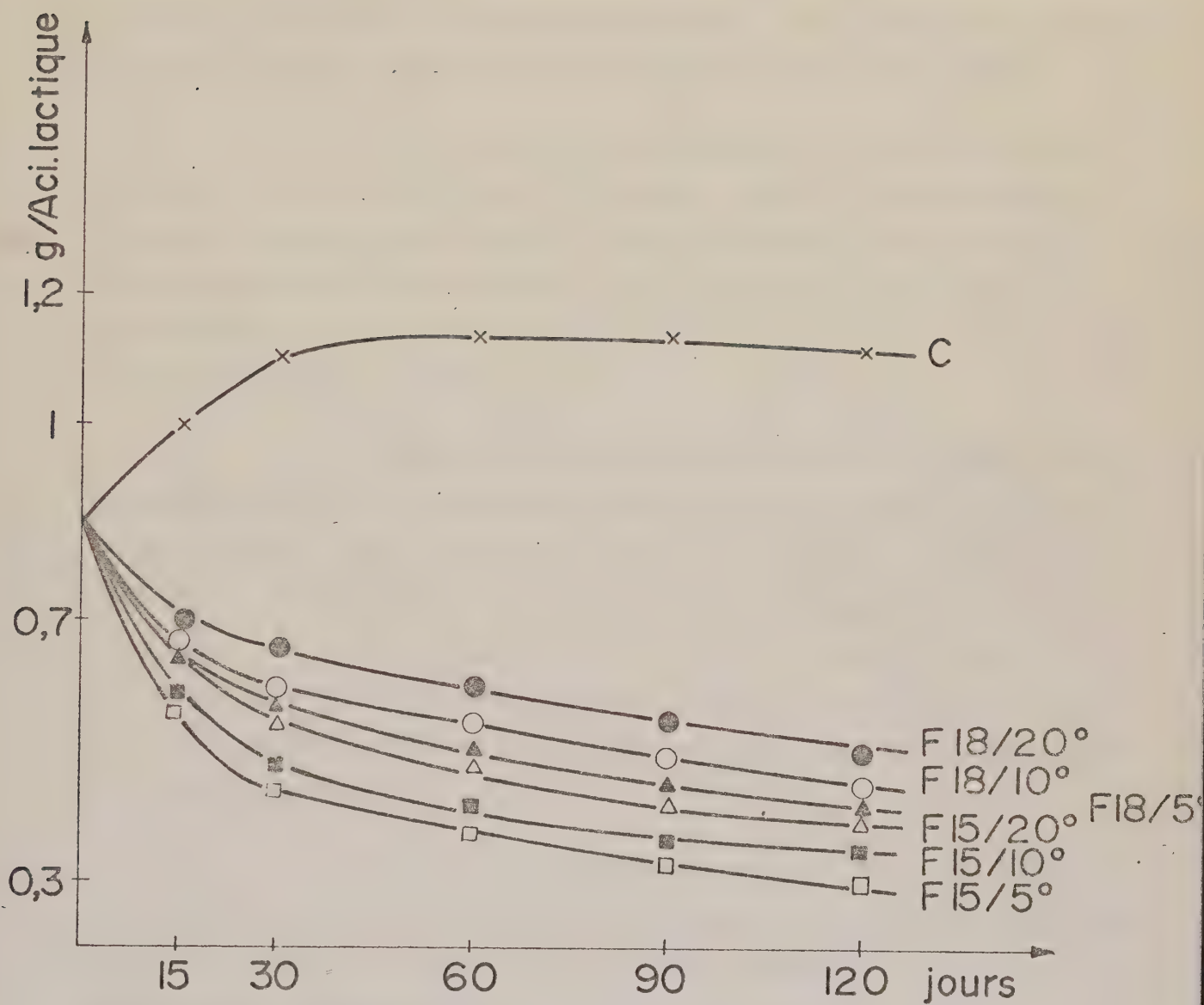


Fig. 3. - Evolution de l'acidité lactique au cours de la conservation.

C : fromage sous "Cryovac" à 10°C ; F 15/20° : fromage dans la saumure à 15 % et à 20°C ; F 18/20° : fromage dans la saumure à 18 % et à 20°C, etc....

3.1.3. - Evolution de l'humidité et diffusion du sel :

Dans le tableau 3 sont montrées l'évolution de l'humidité et de la teneur en chlorure de sodium en fonction de la concentration de la saumure (15 et 18 %) et de la température (5°, 10° et 20°C) ; par comparaison, les résultats obtenus avec l'emballage "Cryovac" sont indiqués.

En ce qui concerne l'humidité, on voit qu'elle décroît, à toutes les températures, dans la saumure à 18 % ; la décroissance est rapide au départ, surtout à 20°C, ce qui correspond à un fort drainage. Aux basses températures, la perte est moins importante. Après 120 jours de conservation, la perte d'humidité est respectivement 10,5 ; 7,7 et 6,3 respectivement à 20°, 10° et 5°C.

Dans la saumure à 15 %, on observe une diminution de l'humidité durant les 30 premiers jours, bien que plus faible que dans la saumure à 18 % ; mais après cette période, le fromage se réhydrate à 5°C et à 10°C, alors qu'à 20°C, l'humidité ne change pratiquement plus. De ce fait, dans cette saumure à 15 %, l'humidité finale, après 120 jours, à 5° et 10°C, est plus forte qu'au départ (respectivement 2 et 1,2 % en plus) ; à 20°C au contraire, l'humidité en fin de conservation est inférieure de 6,4 à la valeur de départ.

Dans le fromage sous emballage "Cryovac", la perte d'humidité est minime (2,4 en 120 jours) ; mais il ne s'agit pas simplement de pervaporation, car on observe une légère exsudation du liquide entre le fromage et le film plastique.

En ce qui concerne la diffusion du sel, on observe qu'au début du séjour dans la saumure, la teneur en NaCl est proportionnelle à la concentration et à la température de la saumure. L'absorption de sel est la plus grande dans la saumure à 18 % et à 20°C ; après 30 jours, le fromage a atteint sa capacité maximale à cette température ; au contraire, à 10° et à 5°C, la diffusion du sel dans le fromage va se poursuivre lentement, et la teneur finale sera plus élevée qu'à 20°C. Dans la saumure à 15 %, la diffusion du sel est progressive aux trois températures de conservation ; mais la teneur

Tableau 3

Teneur en sel et humidité des fromages

Durée de conservation (jours)	Concentration de la saumure %	Conservation dans la saumure												Emballage "Cryovac"		
		à 5°C			à 10°C			à 20°C			à 10°C			à 10°C		
		H	S	S/H	H	S	S/H	H	S	S/H	H	S	S/H	H	S	S/H
0 (frais)		54,5	2,04	3,74	54,5	2,04	3,74	54,45	2,04	3,74	54,5	2,04	3,74	54,5	2,04	3,74
15	15	53,5	5,3	9,9	52,8	5,4	10,22	50,6	5,85	11,56	53,1	2,1	3,95	53,1	2,1	3,95
	18	51,4	5,8	11,24	50,4	6,0	11,9	45,6	6,2	13,6						
30	15	52,8	7,2	13,63	51,5	6,5	12,62	48,5	6,7	13,81	52,8	2,18	4,1	52,8	2,18	4,1
	18	50,7	6,75	13,31	49,5	6,7	13,53	44,7	6,87	15,34						
60	15	55,4	7,8	14,07	52,0	7,01	13,48	48,7	6,9	14,16	52,1	1,9	3,64	52,1	1,9	3,64
	18	48,5	7,25	14,93	47,8	6,9	14,43	44,3	6,9	15,57						
90	15	55,3	7,9	14,28	55,8	7,51	13,45	48,8	7,01	14,36	52,1	1,9	3,64	52,1	1,9	3,64
	18	48,1	7,52	15,6	47,5	7,1	14,94	43,9	6,77	15,42						
120	15	56,5	8,1	14,2	55,7	7,9	14,18	48,1	7,1	14,76	52,1	1,92	3,67	52,1	1,92	3,67
	18	48,2	7,8	15,9	46,8	7,2	15,38	44,0	6,8	15,45						

H = Humidité %

S = Na Cl % de poids total

S/H = Na Cl % d'eau.

Sous emballage "Cryovac", la teneur en sel décroît un peu en fin de conservation, comme la teneur en eau et c'est probablement pour la même cause : l'exsudation de lactosérum.

3. 1. 4. - Contrôle chimique de l'affinage :

La dégradation des protéines au cours de l'affinage est un problème capital ; nous l'avons donc étudié avec assez de détail, et nous nous sommes préoccupés de choisir une méthode convenable de contrôle.

3. 1. 4. 1. - Méthode d'extraction de la matière azotée soluble :

Huit dosages de la matière azotée soluble ont été faits en parallèle sur le filtrat à pH 4,4 de la suspension de fromage dans le citrate trisodique et sur le liquide d'extraction à l'eau chaude, dont le pH varie entre 5,15 et 5,30. Le tableau 4 (colonnes 1 et 2) présente les résultats. Un calcul statistique (55) montre que le test T (rapport de la différence des moyennes à l'erreur standard) est significatif avec un coefficient de sécurité de 99 % ; donc la différence observée est due à la méthode. Lorsqu'on extrait la matière azotée soluble par l'eau chaude, selon les indications de LING (60), sans régler le pH, on obtient un taux d'azote plus élevé que par la méthode de KNUDSEN et OVERBY reprise par BEAU (12, 49).

Nous avons fait une nouvelle série de dosages, cette fois en mesurant la densité optique du filtrat à 174 nm, après avoir ajusté à 4,4 le pH du liquide d'extraction à l'eau chaude et séparé le précipité par filtration. Les résultats sont présentés dans le tableau 4 (colonnes 3 et 4). Le calcul de T montre qu'il est significatif, avec un coefficient de sécurité de 99 % ; le faible écart est dû à la méthode. L'eau chaude extrait du fromage des produits de dégradation insolubles, à pH 4,4 ; mais après ajustement du pH, la quantité de matières azotées réellement soluble est un peu inférieure à celle obtenue par l'extraction au citrate. Nous avons donc finalement utilisé cette dernière méthode.

Tableau 4

Comparaison des méthodes d'extraction (*)

	Azote soluble (gN p. 1000 g de fromage)		Densité optique à 274 nm	
	Suspension au citrate (pH 4,4)	Eau chaude (pH 5,15 - 5,30)	Suspension au citrate (pH 4,4)	Eau chaude et précipit. à pH 4,4
	(1)	(2)	(3)	(4)
	3,0	3,2	0,440	0,465
	2,8	3,8	0,355	0,340
	3,0	3,4	0,365	0,365
	3,0	3,5	0,455	0,395
	2,8	3,6	0,360	0,450
	2,9	3,5	0,345	0,370
	2,9	3,4	0,460	0,350
	2,8	3,7	0,445	0,400
Totaux :	23,2	28,1	3,228	3,135
Moyennes	2,9	3,5	0,403	0,392

(*) Deux séries sur des échantillons différents d'une série à l'autre.

3.1.4.2. - Corrélation entre la mesure de la densitéoptique du filtrat et la teneur en azote soluble :

Sur un filtrat à pH 4,4 de la suspension citratée du fromage, on a mesuré la densité optique à 274 nm, et dosé l'azote soluble par micro-Kjeldahl. Le tableau 5 présente les résultats moyens de 8 essais comparatifs à différentes périodes de l'affinage.

A partir de ce tableau, nous avons ^{cherché} la relation entre la densité optique du filtrat et la teneur en azote soluble. Le coefficient (r) trouvé est égal à 0,80. Il existe donc une bonne corrélation positive,



pour une sécurité de 95 % entre les résultats que donne, d'une part le dosage de l'azote soluble, et d'autre part, la méthode photométrique rapide préconisée par VAKALERIS et PRICE (88). La droite de régression présentée par la figure 4 permet d'estimer la teneur en azote soluble dans le fromage en mesurant la densité optique du filtrat citraté. La formule correspondante est :

$$Y = 1,92 X + 0,14 .$$

Tableau 5

Corrélation entre la densité optique et l'azote soluble

D. O.	N. sol. g %
(5)	(6)
0,310	0,120
0,510	0,194
0,465	0,140
0,415	0,180
0,270	0,100
0,610	0,240
0,800	0,280
0,840	0,360

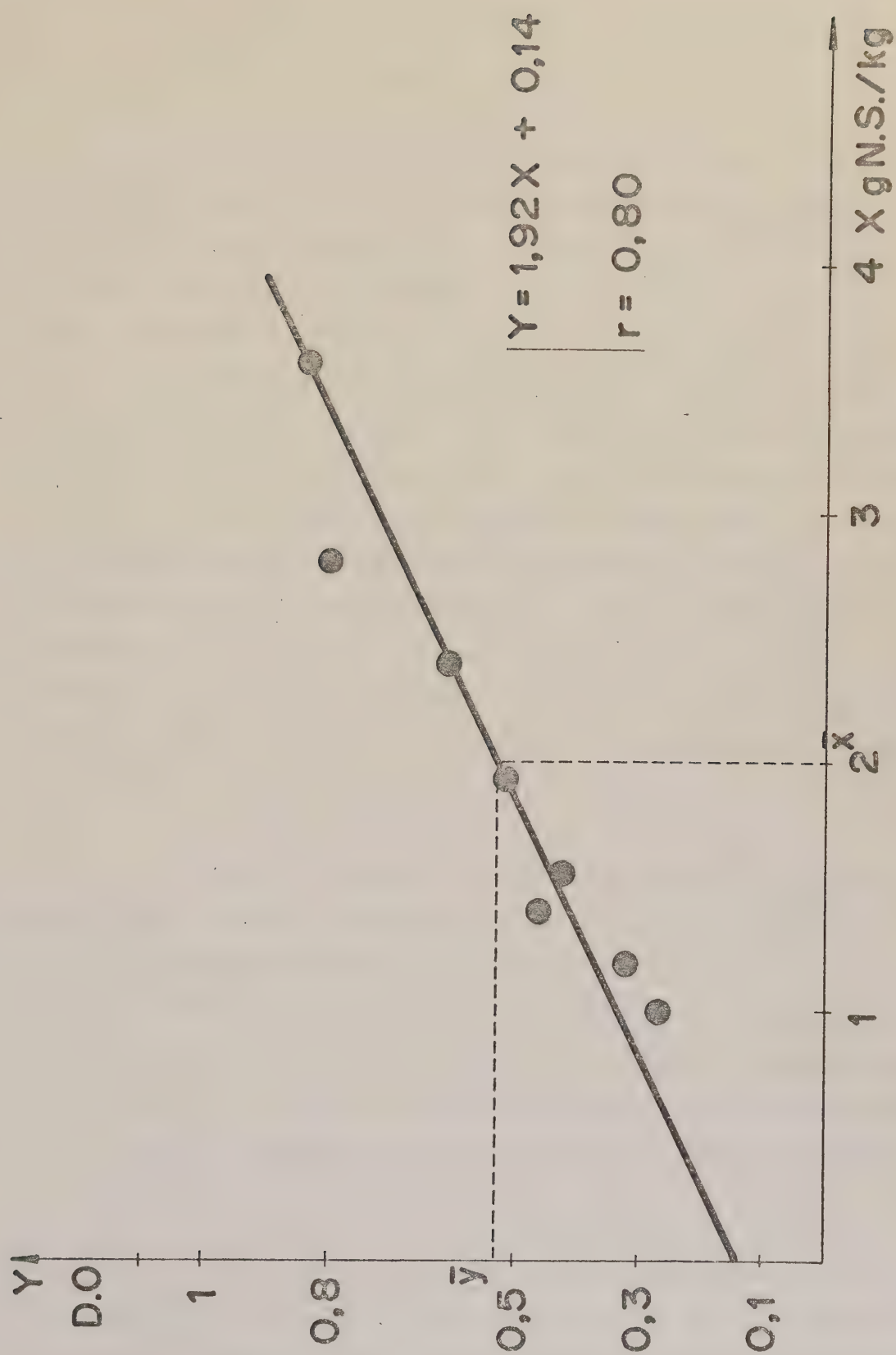


Fig. 4. - Droite de régression

3.1.4.3. - Evolution de l'azote soluble (NS) et de
l'azote non protéique (NPN) :

Les dosages de ces deux formes de l'azote ont été poursuivis pendant 4 mois. NS et NPN sont exprimés p. 100 de l'azote total dans les figures 5 et 6. On voit que la protéolyse est très lente dans ce type d'affinage et que la température a une influence dominante ; cependant la concentration en sel influe un peu. A 5°C, la protéolyse est pratiquement inhibée. A 10°C, il y a un écart notable entre le fromage dans la saumure à 15 % et celui dans la saumure à 18 %. Il est à noter que dans les conditions 10°C/15 % on obtient un rapport de maturation voisin de celui à 20°C/18 % ; or, dans le premier cas, le rendement et la texture du fromage sont bien meilleurs après 4 mois de conservation ; c'est une indication intéressante en pratique. Dans le fromage conservé à 10°C sous "Cryovac", l'affinage est beaucoup plus rapide ; le rapport de maturation est finalement 2,5 fois plus grand que celui du fromage en saumure à la même température.

Le N. P. N. évolue comme l'azote soluble, mais d'une manière plus limitée. Après le présalage et avant la mise en saumure, le pourcentage de NPN dans l'azote soluble est de 64 % ; à la fin de la conservation, il est de 56,5 % à 20°C et 15 % de sel (solubilisation maximale), et de 60 % à 5°C et 18 % de sel (solubilisation minimale). Il y a donc peu de changement dans la part que représente le NPN dans les substances azotées solubles, au cours de l'affinage.

Dans le cas de la conservation "Cryovac" à 10°C, le pourcentage de NPN dans l'azote soluble n'est finalement que de 47 % ; si la solubilisation est rapide dans cet emballage, le fractionnement des peptones et gros peptides en plus petites molécules est, par contre, assez limité.

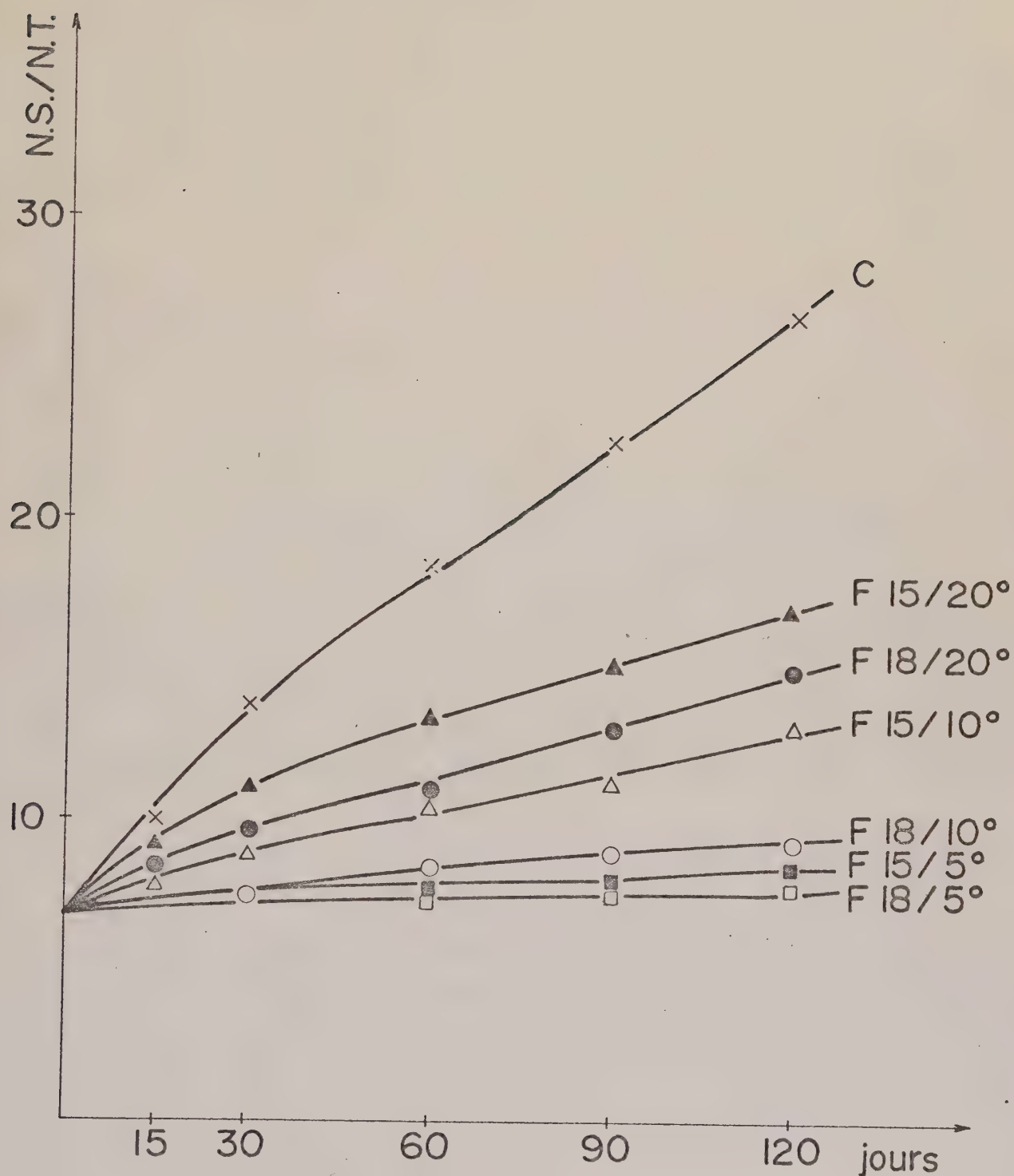


Fig. 5. - Evolution de l'azote soluble au cours de la conservation.

C : fromage sous "Cryovac" à 10°C ; F 15/20° : fromage dans la saumure à 15 % et à 20°C ; F 18/20° : fromage dans la saumure à 18 % et à 20°C, etc

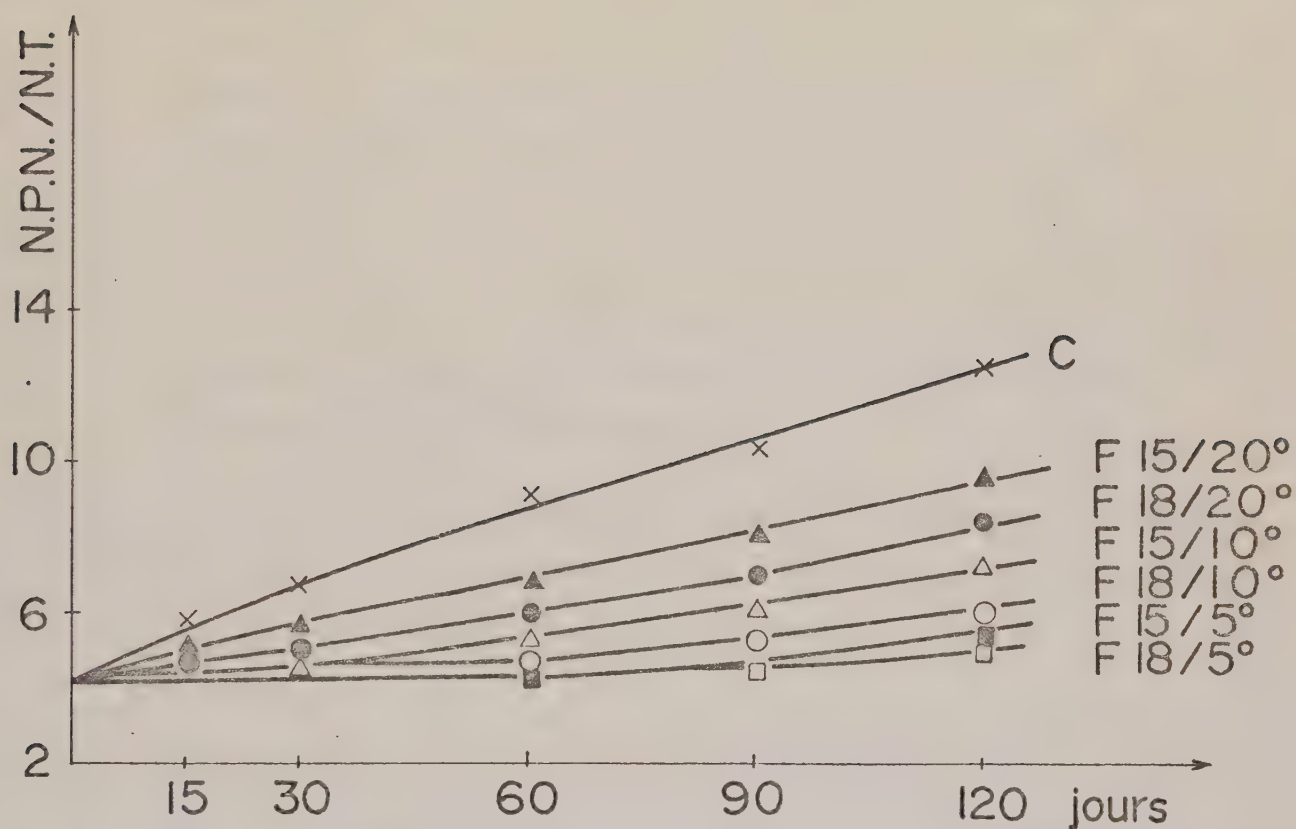


Fig. 6. - Evolution de l'azote non protéique au cours de la conservation.
 C : fromage sous "Cryovac" à 10°C ; F 15/20° : fromage dans la saumure à 15 % et à 20°C ; F 18/20° : fromage dans la saumure à 18 % et à 20°C, etc....

3.1.5. - Etude électrophorétique des protéines du fromage :

L'objet de l'étude électrophorétique était de suivre la dégradation des protéines dans le fromage conservé en saumure ; nous avons utilisé l'électrophorèse en gel d'amidon. La figure 7 révèle la dégradation de la caséine du fromage au cours de l'affinage, dans les quatre régions des bandes électrophorétiques : Caséine α_s , β , K et γ . La caséine α_s se divise dès le début de la conservation et jusqu'au 60ème jour en deux bandes ; ensuite à 4 mois, on observe une troisième bande. La caséine β est stable ; au cours de la conservation on trouve toujours qu'une seule bande. La zone de la caséine K se modifie très rapidement, sous l'action de la présure ; trois bandes sont formées après l'emprésurage ; il faut noter aussi que la paracaséine K migre vers la cathode et ne se dégrade pas.

La dégradation de la caséine, d'après ces résultats, est lente ; cela est conforme aux données que nous avons obtenues sur la maturation de ce genre de fromage.

Nous avons complété cette étude électrophorétique en comparant différentes sortes de fromages français avec le fromage syrien. La figure 8 montre les diagrammes d'électrophorèse du Camembert, du Munster, du Saint-Paulin et du fromage blanc salé en saumure. Les trois premiers étaient en stade de la consommation. On voit que chaque fromage donne une image caractéristique ; dans le Saint-Paulin, la dégradation des caséines est moins poussée que dans le Camembert et le Munster. Dans ces deux derniers, on constate la disparition de certaines bandes, notamment dans la zone des caséines α_s ; quand à la caséine β , on remarque qu'elle est divisée en plusieurs bandes. On remarque aussi, que la paracaséine K (migrant vers la cathode) est dégradée dans les trois fromages français, par contre dans le fromage salé, elle ne l'est pas.

Fig. 7. - Electrophorèse sur gel d'amidon de la fraction protéique insoluble à pH 4,6 du fromage blanc salé :

A : caséine de vache ; B : fromage frais ; C : fromage à 30 jours ; D : fromage à 60 jours ; E : fromage à 120 jours.

. Fig. 8. - Electrophorèse sur gel d'amidon de la fraction protéique insoluble à pH 4,6 de fromages :

A : Camembert ; B : Munster ; C : Saint-Paulin ;

D : fromage blanc salé.

3.1.6. - Identification et dosage des acides aminés libres.

3.1.6.1. - Identification :

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier, les acides aminés libres, en utilisant la chromatographie sur papier à deux dimensions. Cette technique nous a permis à déterminer qualitativement, les acides aminés libérés au cours de l'affinage. Le tableau 6 montre que, dès le début de la maturation, 13 acides aminés sont présents ; par contre 4 acides aminés contenus dans les caséines n'apparaissent pas encore (Pro, Gly, Cys, Phe). A 4 mois de conservation, apparaissent 2 nouveaux acides aminés, la glycine et la phénylalanine dans le fromage salé en saumure et celui conservé dans le Cryovac. A 6 mois, on constate l'apparition de la cystine dans le fromage conservé en saumure.

Donc après 6 mois d'affinage, nous avons pu identifier 16 acides aminés dans le fromage en saumure, et 15 dans celui conservé sous Cryovac. En ce qui concerne la proline, nous ne l'avons pas identifiée avec certitude.

La chromatographie sur papier à deux dimensions s'est révélée assez précise. La figure 9 montre, à titre d'exemple, une bonne séparation des acides aminés libres du fromage salé à 4 mois de conservation.

3.1.6.2. - Dosage quantitatif :

Le tableau 7 montre les résultats analytiques obtenus après 6 mois de conservation du fromage. On trouve que le fromage conservé sous Cryovac contient trois fois plus d'acides aminés libres que celui conservé en saumure : 3,693 g./Kg dans le premier contre 1,235 g dans le deuxième. Cela confirme une fois de plus que l'affinage est fortement ralenti sous l'action du sel, dans le cas du fromage ayant séjourné longtemps en saumure.

Tableau 6

Recherche des acides aminés libres dans le fromage

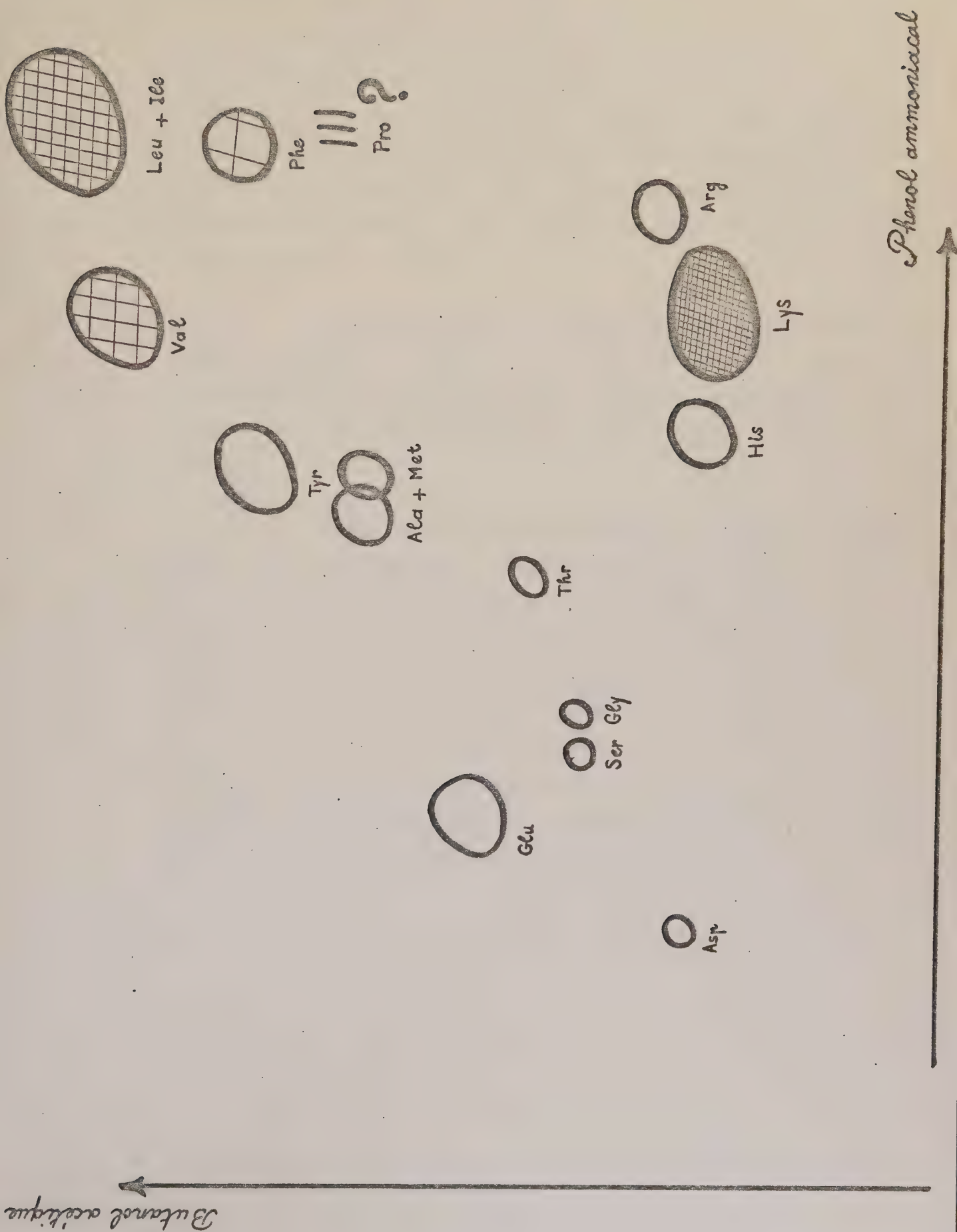
Période de conservation	Frais	A 4 mois		A 6 mois	
Acide aminé	(*)	F. S.	F. C.	F. S.	F. C.
Acide aspartique	+	+	+	+	+
Thréonine	+	+	+	+	+
Sérine	+	+	+	+	+
Acide glutamique	+	+	+	+	+
Proline	-	?	?	?	?
Glycine	-	+	+	+	+
Slanine	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+
Cystine	-	-	-	+	-
Méthionine	+	+	+	+	+
Isoleucine	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+
Phénylalanine	-	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+
Histidine	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+

(*) : Fromage âgé de 48 h.

F. S. : Fromage salé en saumure à 18 % du sel et 10°C.

F. C. : Fromage emballé sous "Cryovac".

Fig. 9. - Chromatogramme sur papier.



Les proportions des divers acides aminés libres des fromages montrent une variation très sensible d'un fromage à l'autre (figure 10). La teneur en acides aspartique et glutamique, thréonine, sérine, glycine, alanine, méthionine, leucine et arginine est largement inférieure dans le fromage affiné en saumure par rapport au fromage affiné sous Cryovac ; par contre, on trouve que la teneur en valine, isoleucine, tyrosine, histidine et surtout en lysine est supérieure dans le fromage en saumure.

Quant à la proline et la phénylalanine, leurs teneurs dans les deux cas sont comparables. Il faut ajouter que la cystine, représente 2,85 % des acides aminés libres totaux du fromage salé en saumure ; par contre, on ne l'a pas décelée dans le fromage sans Cryovac.

La figure 10 montre en outre, que les proportions des divers acides aminés libres sont différentes, pour la plupart d'entre eux, des proportions de ces mêmes acides aminés dans la caséine entière, dont ils proviennent principalement. La protéolyse qui progresse au cours de l'affinage en saumure libère peu de proline, de diacides aminés (Asp, Glu) d'hydroxyaminoacides (Thr, Ser) et des premiers acides aminés neutres (Gly, Ala) ; au contraire, les acides aminés basiques (Lys, Arg, His), ainsi que la valine, l'isoleucine et la phénylalanine représentent une proportion nettement supérieure dans le pool des acides libres par rapport à la caséine.

Tableau 7

Composition en acides aminés libres des fromages

	Fromage salé		Fromage Cryovac		Caséine entière*
	% des A. A. totaux	mg/Kg fromage	% des A. A. totaux	mg/Kg fromage	% des A. A. totaux
Acide aspartique	0,65	8,06	3,3	122	7,1
Thréonine	0,89	11,03	3,51	129,7	4,9
Sérine	0,78	9,62	3,28	121,15	6,3
Acide glutamique	4,25	52,51	26,87	992,29	22,4
Proline	1,97	24,31	1,51	55,73	11,3
Glycine	0,44	5,41	1,48	54,52	2,7
Alanine	1,1	13,69	4,09	150,95	3,0
Valine	13,1	162,9	4,68	172,8	7,2
Cystine	2,85	35,17	0	0	0,34
Méthionine	2,53	31,29	4,96	183,37	2,8
Isoleucine	5,82	72,00	0,82	30,22	6,1
Leucine	14,2	175,48	16,5	609,5	9,2
Tyrosine	6,64	82,01	2,78	102,68	6,3
Phénylalanine	9,21	113,73	8,87	327,46	5,0
Tryptophane	-	-	-	-	1,7
Lysine	24,19	298,84	8,01	295,93	8,2
Histidine	6,1	75,42	2,08	76,75	3,1
Arginine	5,15	63,15	7,25	267,68	4,1
TOTAL		1 235,15		3 692,69	

* d'après GORDON et al. (37) (après hydrolyse acide) pour comparaison

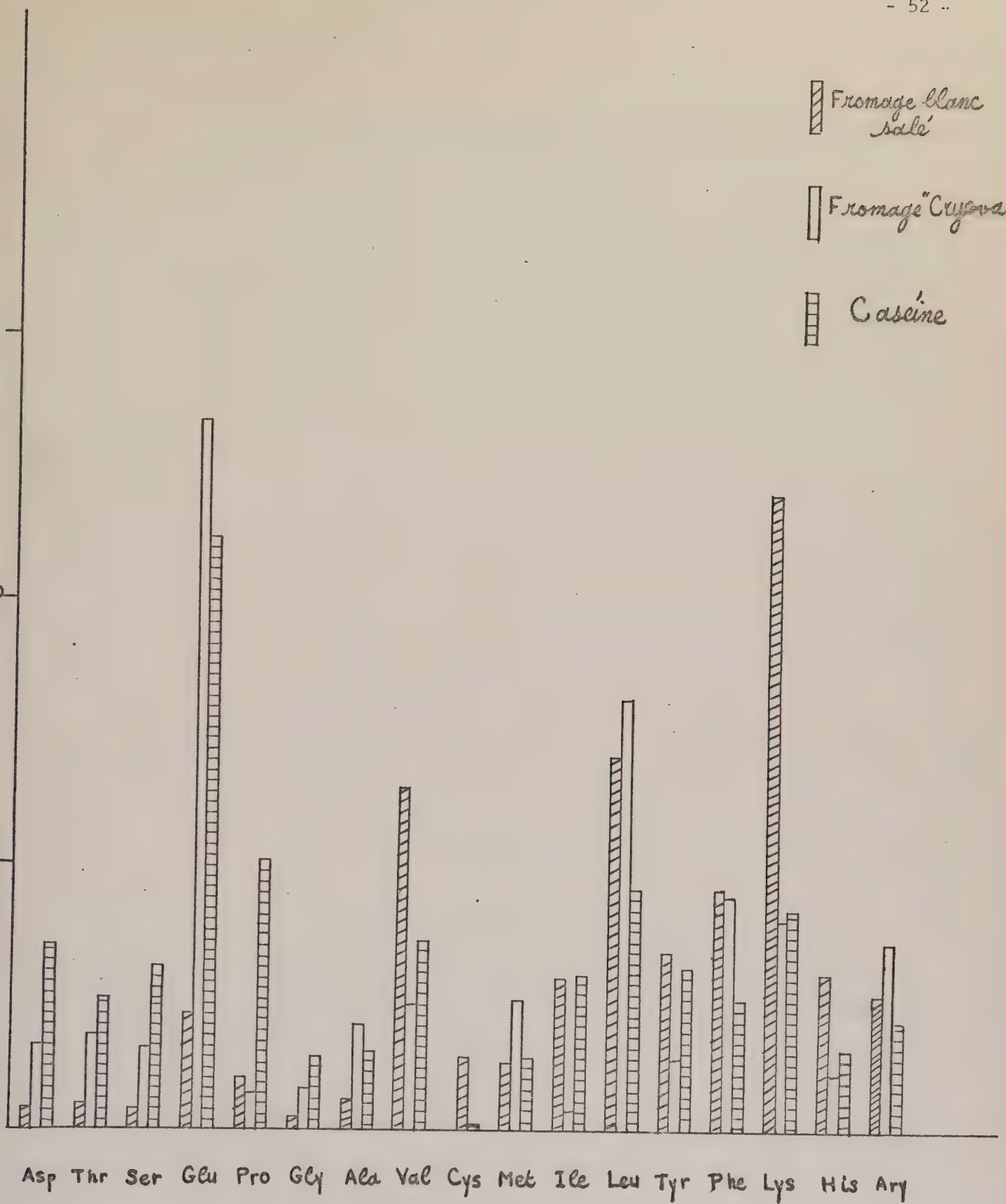


Fig. 10. - Composition en acides aminés libres des fromages en p. 100 des acides aminés totaux, comparée à celle de la Caséine.

3.1.7. - Evolution de la matière grasse et du degré de lipolyse.

3.1.7.1. - Matière grasse :

Le tableau 8 montre que la teneur en matière grasse dans l'extrait sec augmente sensiblement au cours de la conservation du fromage à 20°C, dans les deux saumures ; il y a donc à cette température, une perte de matières non grasses dans la saumure ; nous verrons plus loin que le passage de matières azotées solubles, de minéraux et de lactose est plus important à 20°C qu'à plus basse température.

A 5° et 10°C, dans la saumure la plus concentrée (18 %), la teneur en matière grasse change peu au cours de la conservation, comme d'ailleurs dans le fromage "Cryovac" à 10°C. Par contre, dans la saumure à 15 %, à ces basses températures, on observe une diminution assez importante de la teneur en matière grasse dans l'extrait sec ; nous avons vu plus haut que l'absorption du sel est la plus forte dans ces conditions ; ce fait peut expliquer une partie de la diminution du taux de matière grasse ; un calcul à partir des résultats du tableau 3 montre qu'il y a en moyenne 18 % de Na Cl dans ces fromages, alors que la proportion tombe en dessous de 13 % dans tous les autres.

3.1.7.2. - Lipolyse :

Le tableau 8 montre que la lipolyse n'a pas été freinée par la teneur élevée en sel, contrairement à ce que l'on a observé pour la protéolyse. Dans les fromages conservés en saumure à 15 ou à 18 %, on obtient un degré de lipolyse supérieur à celui obtenu dans l'emballage "Cryovac", pour la même température de conservation (10°C). La lipolyse est plus rapide à 20°C qu'à 10° et 5°C, mais la concentration de la saumure n'a pas une influence nette ; le degré de lipolyse est peu différent à 15 % et à 18 % de sel.

Tableau 8

Le degré de lipolyse (D. L.) et la teneur en matière grasse % de l'extrait sec (MG % ES) des fromages

Période de la conservation (jours)	Conservation en saumure à 15 %						Conservation en saumure à 18 %						Emballage Cryovac	
	5°C			10°C			5°C			10°C			20°C	
	MG % ES	D. L.		MG % ES	D. L.		MG % ES	D. L.		MG % ES	D. L.		MG % ES	D. L.
0 (frais)	50,2	0,5 (100)		50,2	0,5 (100)		50,2	0,5 (100)		50,2	0,5 (100)		50,2	0,5 (100)
15	47,9	-		49,3	-		49,05	-		48,1	-		48,41	-
30	46,1	0,6 (120)		48,98	1,1 (220)		50,5	0,57 (114)		49,9	1,00 (200)		49,13	1,23 (246)
60	46,18	6,65 (130)		47,54	1,7 (340)		50,58	0,6 (120)		50,3	1,65 (330)		49,49	1,7 (340)
90	43,8	0,68 (136)		49,5	2,1 (420)		50,4	0,65 (130)		50,6	1,95 (390)		51,19	2,2 (440)
120	46,2	0,75 (150)		47,8	2,45 (490)		51,00	0,78 (156)		50,3	2,3 (460)		52,3	2,7 (540)

(...) nombre proportionnel.

3.1.8. - Evolution des minéraux dans le fromage conservé
en saumure :

Les tableaux 9 et 10 montrent que la teneur du fromage en éléments minéraux à l'exclusion du sodium décroît dans tous les fromages conservés dans la saumure à 15 ou à 18 % de sel. La décroissance est d'autant plus rapide, au début du moins, que la température est plus élevée et la teneur du sel plus forte. Les teneurs en potassium et magnésium, déjà faibles au départ, sont réduites à l'état de traces après 15 ou 30 jours de saumurage. Les teneurs en calcium et en phosphore suivent la même évolution. On remarque qu'à basse température les pourcentages de calcium et de phosphore deviennent légèrement plus élevés dans le fromage conservé avec 18 % de sel que dans le fromage conservé avec 15 % de sel ; ce résultat est en rapport avec les extraits secs de ces fromages ; le fromage à 15 % a absorbé plus d'eau dans ces conditions.

En revanche, le taux de cendres augmente fortement au cours de la conservation et dans toutes les conditions ; on trouve cependant qu'il y a des variations entre les fromages, cette variation est due à leur teneur en sel ; autrement dit, le taux en cendre varie parallèlement à celui du sel. Les cendres représentent 3,02 % du fromage frais ; mais au bout de 4 mois, on en trouve 8,25 ; 8,15 et 7,5 p. 100 dans le fromage conservé en saumure à 15 % à 5°, 10° et 20°C, contre 8,1 ; 7,30 et 7,2 p. 100 dans le fromage conservé en saumure à 18 % de sel aux mêmes températures.

Dans le fromage "Cryovac", les taux de minéraux et des cendres restent presque stables. On trouve à la fin de la conservation 0,58 % de Ca ; 0,47 % de P ; 0,11 % de K ; 0,015 % de Mg et 3,0 % de cendres.

Tableau 9

* Teneur en minéraux du fromage conservé dans une saumure à 15 % de sel.

* p. 100

Période de la conser- vation (jours)	5°C						10°C						20°C					
	Ca	P	K	Mg	cen- dres		Ca	P	K	Mg	cen- dres		Ca	P	K	Mg	cen- dres	
0	0,59	0,47	0,12	0,018	3,02		0,59	0,47	0,12	0,018	3,02		0,59	0,47	0,12	0,018	3,02	
15	0,56	0,46	0,05	0,01	6,8		0,51	0,45	0,03	traces	6,95		0,45	0,42	traces	traces	6,92	
30	0,52	0,41	0,04	traces	7,2		0,48	0,42	0,01	-	7,2		0,41	0,39	-	-	7,1	
60	0,48	0,38	0,03	-	7,5		0,45	0,39	-	-	7,4		0,38	0,38	-	-	7,35	
90	0,40	0,37	0,03	-	8,1		0,40	0,37	-	-	7,9		0,37	0,37	-	-	7,46	
120	0,37	0,33	0,03	-	8,25		0,36	0,35	-	-	8,15		0,37	0,37	-	-	7,5	

Tableau 10

Teneur en minéraux p. 100 du fromage conservé dans une saumure à 18 % de sel.

Période de la conservation (jours)	5°C						10°C						20°C					
	Ca			Mg			Cendres			Ca			Ca			Ca		
	P	K		P	K		P	K		P	K		P	K		P	K	
0	0,59	0,47	0,12	0,018	3,02		0,47	0,12	0,018	3,02		0,59	0,47	0,12	0,018	0,59	0,47	0,12
15	0,55	0,45	traces	traces	7,1		0,43	traces	traces	6,9		0,49	0,43	traces	traces	0,40	0,40	traces
30	0,50	0,42	-	-	7,3		0,41	-	-	7,1		0,45	0,41	-	-	0,35	0,35	-
60	0,46	0,37	-	-	7,6		0,35	-	-	7,15		0,40	0,35	-	-	0,35	0,34	-
90	0,44	0,36	-	-	7,96		0,34	-	-	7,25		0,38	0,34	-	-	0,35	0,34	-
120	0,40	0,35	-	-	8,1		0,34	-	-	7,30		0,37	0,34	-	-	0,35	0,34	-

3.1.9. - Rendement en fromage :

Le tableau 11 montre que le rendement décroît très rapidement au cours de la conservation en saumure à la température ambiante. Avec 18 % de sel, le fromage perd environ 15 % de son poids initial, avec 15 % de sel il en perd 10 %. En même temps, l'extrait sec augmente beaucoup ; la température élevée et la teneur en sel accélèrent la synérèse. Ce résultat est important pour un fromage vendu au poids, sans tenir compte de son extrait sec.

En ce qui concerne la conservation à 10°C, il y a encore une faible perte de poids à 18 % de sel, alors qu'à 15 % le poids et le rendement augmentent ; l'extrait sec a évolué de façon opposée dans ces deux saumures.

A basse température (5°C), il y a un gain de poids et de rendement, mais ils sont très différents selon la saumure, comme le sont les extraits secs. Avec 15 % de sel, l'augmentation de poids est de 8,6, le fromage contient plus d'eau qu'au départ. Avec 18 % de sel, le poids n'augmente que de 1,0 et l'extrait sec de 6,3 % ; le passage du sel dans le fromage est plus important que le drainage vers la saumure.

Le fromage conservé sous "Cryovac" à 10°C ne perd que 1,35 % de son poids après 120 jours de conservation. Cette faible perte est en relation d'une part, avec la basse perméabilité à l'eau des films plastiques, et d'autre part, à leur résistance à l'acide lactique (20).

Tableau 11

Extrait sec des fromages et rendement

Période de la conservation (jours)	Concentration de la saumure %	conservation en saumure												Emballage Cryovac		
		5°C				10°C				20°C				10°C		
		E. S.	V	R		E. S.	V	R		E. S.	V	R		E. S.	V	R
0 (frais)		45,5	-	15		45,5	-	15		45,5	-	15		45,5	-	15
15	15	46,6	+ 3,3	15,5		47,2	0	15		49,4	- 1,4	14,8		46,9	- 0,5	14,92
	18	48,6	- 0,2	14,97		49,6	- 0,7	14,9		54,4	- 3,4	14,5				
30	15	47,2	+ 5,3	15,8		48,5	+ 1,3	15,2		51,5	- 6	14,1		47,2	- 1,2	14,82
	18	49,3	+ 0,1	15,02		50,5	- 2	14,7		55,3	- 8	13,8				
60	15	45,6	+ 7,3	16,1		48,00	+ 3,3	15,5		51,3	- 7,4	13,9		47,95	- 1,25	14,85
	18	51,5	+ 0,6	15,1		52,2	- 4	14,4		55,7	- 12,7	13,1				
90	15	45,7	+ 8,00	16,2		44,2	+ 4,6	15,7		51,2	- 10	13,5		47,9	- 1,3	14,8
	18	51,9	+ 0,5	15,08		52,2	- 1,4	14,8		56,1	- 15	12,75				
120	15	43,5	+ 8,6	16,3		44,3	+ 5,3	15,8		51,9	- 10	13,5		48,00	- 1,35	14,9
	18	51,8	+ 1,0	15,15		53,2	- 0,34	14,95		56,00	- 14,7	12,8				

E. S. : extrait sec p. 100 - R : rendement, Kg de fromage p. 100 Kg de lait.
V : variation de poids en p. 100 par rapport à la valeur initiale.

3. 1. 10. - Appréciation des caractères organoleptiques

Nous avons effectué un examen organoleptique, sur le produit final (120 jours de conservation). Les caractères les plus importants sont ceux de la pâte ; car ils résultent des fermentations qui surviennent au cours de l'affinage et, d'une façon générale, les caractères de goût et d'odeur sont pour les fromages liés aux qualités de la pâte. Il existe actuellement des méthodes physiques et physicochimiques intéressantes pour apprécier les caractères organoleptiques des produits laitiers (53) ; mais en tenant compte des conditions très particulières de la fabrication de ce genre de fromage, nous avons réalisé un tableau d'appréciation qui peut convenir à différentes sortes de fromage (tableau 12). D'après l'ensemble des notations attribuées par les cadres de l'Ecole de Laiterie, le fromage emballé sous cryovac a été jugé de bonne qualité. En ce qui concerne le fromage affiné en saumure, il était difficile de tirer une conclusion, car la majorité des examinateurs ne sont pas habitués à ce genre de fromage. A notre avis, ces fromages étaient de bonne qualité dans le cas où ils étaient conservés à basse température (5° et 10°C) et notamment dans la saumure à 15 % de sel. Quand la conservation était de 20°C, le fromage ayant subi un fort drainage, la pâte est devenue à la fin de la conservation dure et inacceptable. Cependant, du point de vue du goût, nous avons constaté que dans ce cas, le goût typique de ce genre de fromage a été obtenu plus rapidement que dans le fromage conservé à basse température. Cela est sûrement dû à une vitesse de maturation supérieure.

Tableau 12
Examen organoleptique

Date :				
Examineur :				
Produit :		Cru ou Pasteurisé :		
Origine :		MG % :		
Age :		EST % :		
Conditions de l'Examen :				
ANALYSE	CRITERES	NOTATION *		
		0	1	2
<u>PATE</u>	Aspect extérieur			
	Coloration			
	Structure			
	Fermeté			
<u>ODEUR</u> et <u>GOUT</u>	Acide			
	Amère			
	Sapide			
	Degré Salage			
	Agréable			
	Aromatique			
NOTE TOTALE SUR 20				
<u>CLASSEMENT</u>	Très bon 16			
	Bon 12			
	Moyen 9			
	Médiocre 6			

* La note 2 correspond au maximum de la qualité ou au minimum du défaut

3.2. - Etude biochimique de la saumure

3.2.1. - Evolution du pH et de l'acidité :

Après 24 heures de conservation, le pH des saumures, dans lesquelles le fromage est plongé, subit une forte baisse ; il passe de 7,15 dans la saumure vierge aux valeurs indiquées dans la figure 11 : 5,15 à 5,30, ensuite il baisse plus lentement jusqu'au 15ème ou au 30ème jour. A basse température (5°C) le pH se maintient vers 5,0 - 5,1 jusqu'à la fin ; par contre le pH des saumures conservées à la température ambiante (20°C), qui a subit une plus forte baisse au début, remonte à partir de 15 jours pour atteindre à la fin 5,6 pour la saumure à 18 % et 5,45 pour celle à 15 %. Quant aux saumures stockées à 10°C, leur pH commence tardivement à remonter, pour arriver à 5,2 à la fin de la conservation.

En ce qui concerne l'acidité, on remarque qu'il y a une augmentation importante (fig. 12). Au début de la conservation, le lactosérum exsudé dans la saumure est chargé en acide lactique et l'on sait que cette exsudation est accélérée pour les températures et les concentrations les plus élevées des saumures. L'acidité est au maximum à 60 jours pour la saumure à 15 % conservée à 10° ou 20°C, ensuite elle décroît sensiblement. Pour la saumure à 18 % de sel et 10 et 20°C, elle se stabilise. Quant aux saumures conservées à 5°C, leur acidité augmente jusqu'à la fin.

3.2.2. - Evolution du Na Cl :

La teneur en sel (tableaux 13 et 14) décroît rapidement dans toutes les saumures ; la décroissance au début est proportionnelle à la température de la conservation et à la concentration. On remarque que la teneur en sel, dans les saumures conservées à la température ambiante, commence à se stabiliser à partir de 30 jours ; par contre, avec celles qui ont été stockées à basse température, la perte en sel se poursuit jusqu'à la fin.

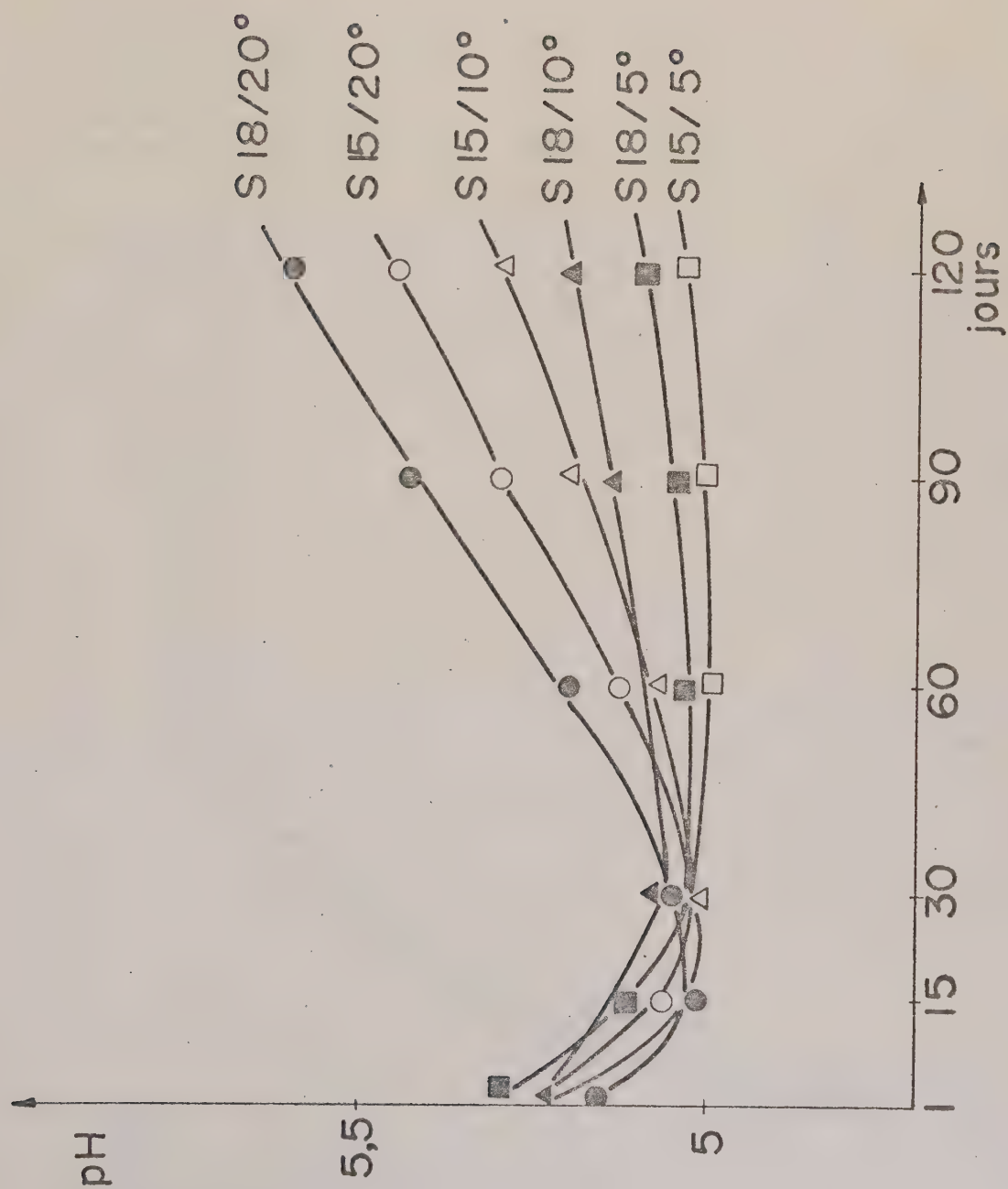


Fig. 11. - Evolution du pH au cours de la conservation : S 18/20° : saumure à 18 % du sel et à 20°C ; S 15/20° : saumure à 15 % du sel et à 20°C, etc....

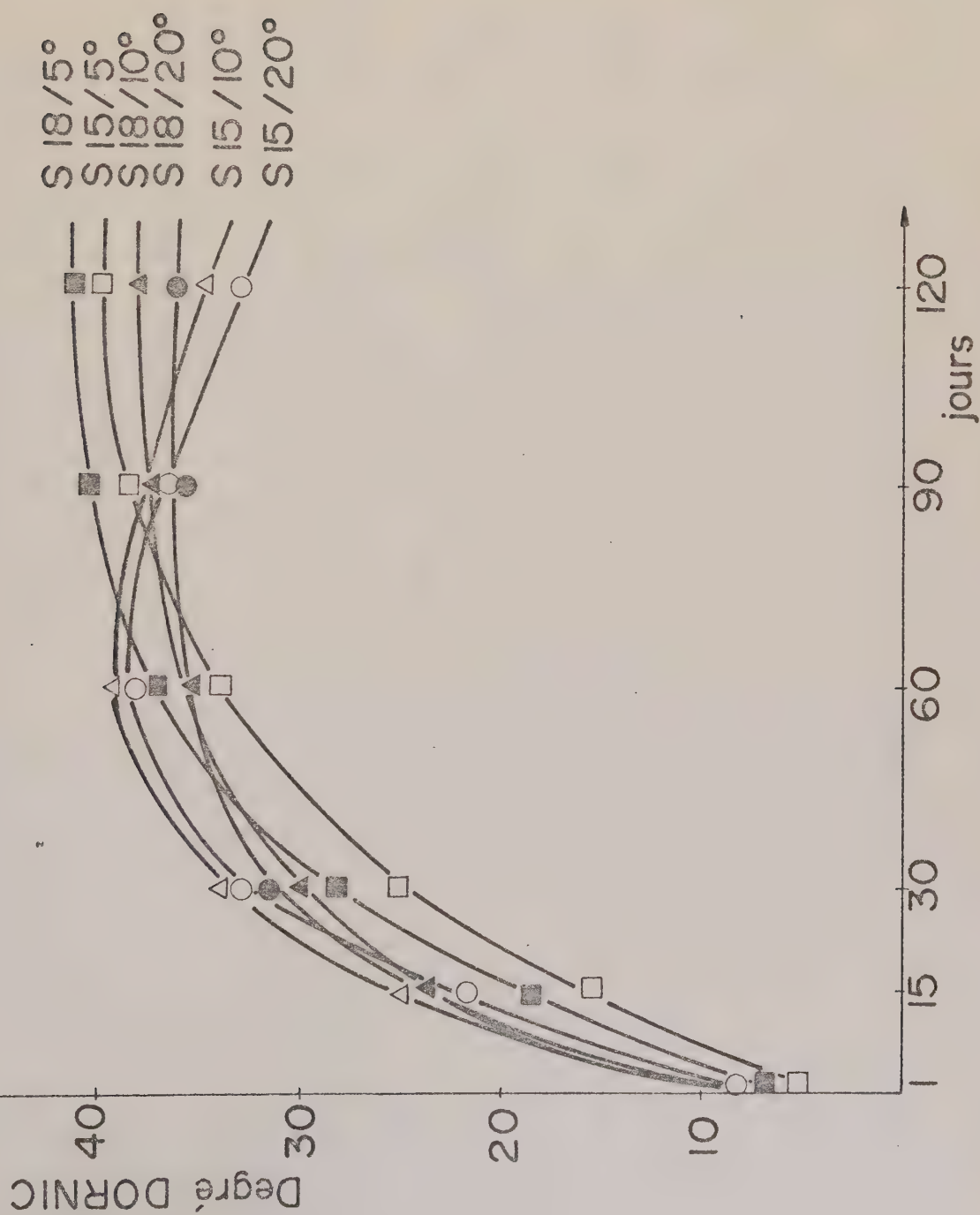


Fig. 12. - Evolution de l'acidité au cours de la conservation (voir les légendes de la fig. 11).

Tableau 13

Evolution des minéraux dans la saumure à 15 % (g/l)

Période de conservation (jours)	5°C						10°C						20°C					
	NaCl		Ca		P		K		Mg		NaCl		Ca		P		K	
	Mg		K		P		Mg		K		Mg		K		P		Mg	
0	150	0,05	-	0,1	-	0,1	150	0,05	-	0,1	-	150	0,05	-	0,1	-	150	0,05
1	145,3	0,52	0,11	0,30	0,05	0,13	144,2	0,55	0,13	0,38	0,06	141,3	0,84	0,25	0,40	0,06	141,3	0,84
15	139,8	0,83	0,28	0,48	0,06	0,30	138,5	0,91	0,30	0,53	0,06	135,4	1,07	0,38	0,58	0,06	135,4	1,07
30	135,5	0,98	0,41	0,51	0,06	0,45	134,6	1,05	0,45	0,60	0,06	123,3	1,25	0,46	0,62	0,06	123,3	1,25
60	129,1	1,15	0,48	0,52	-	0,50	128,7	1,20	0,50	0,61	-	123,0	1,33	0,56	0,60	-	123,0	1,33
90	122,3	1,27	0,51	0,52	-	0,53	121,5	1,25	0,53	0,61	-	122,9	1,35	0,57	0,61	-	122,9	1,35
120	120,5	1,25	0,50	0,52	-	0,56	121,4	1,31	0,56	0,60	-	123,1	1,38	0,60	0,62	-	123,1	1,38

Tableau 14

Evolution des minéraux dans la saumure à 18 ‰ (g/l)

Période de la conserva- tion (jours)	5°C						10°C						20°C					
	NaCl			K			NaCl			K			NaCl			K		
	NaCl	Ca	P	K	Mg		NaCl	Na	P	K	Mg		NaCl	Na	P	K	Mg	
0	180	0,06	-	0,1	-		180	0,06	-	0,1	-		180	0,06	-	0,1	-	
1	173	0,61	0,1	0,35	0,05		171,2	0,75	0,15	0,40	0,05		168,8	0,92	0,3	0,45	0,06	
15	165,2	0,95	0,3	0,48	0,06		162,3	1,05	0,32	0,55	0,06		158,6	1,12	0,44	0,60	0,06	
30	160,4	1,10	0,45	0,50	0,06		158,5	1,20	0,46	0,56	0,06		155,3	1,35	0,52	0,61	0,06	
60	156,3	1,25	0,51	0,50	-		157,5	1,30	0,53	0,55	-		155,2	1,42	0,60	0,65	-	
90	152,5	1,30	0,54	0,49	-		155,8	1,35	0,55	0,57	-		155,4	1,40	0,58	0,64	-	
120	151,8	1,35	0,55	0,51	-		153,2	1,34	0,55	0,56	-		155,5	1,43	0,61	0,63	-	

La saumure à 18 % de sel perd après 120 jours 24,5 ; 26,8 et 28,2 g par litre respectivement pour les températures de 20°, 10° et 5°C ; celle à 15 % perd pendant la même durée et aux mêmes températures : 26,9 ; 28,6 et 29,5 g par litre, c'est-à-dire relativement plus que la saumure précédente.

3. 2. 3. - Taux des autres minéraux :

Les tableaux 13 et 14 montrent que la teneur en calcium, potassium, magnésium et phosphore augmente fortement au cours de la conservation des saumures. On trouve un taux de calcium qui varie entre 1,34 à 1,43 g par litre de saumure à 18 % et entre 1,25 et 1,38 g/l pour celle à 15 %. On remarque que la température et la concentration des saumures jouent un rôle sur leur enrichissement en calcium. Quant au phosphore, son évolution est parallèle à celle du calcium, mais son taux est bien inférieur à celui de ce dernier.

Le taux de potassium arrive à son maximum après 30 jours de conservation ; on en trouve de 0,51 à 0,62 g/l. En ce qui concerne le magnésium, son passage du fromage dans les saumures est rapide ; après 24 h, on trouve environ 0,06 g/l.

3. 2. 4. - Evolution de la matière azotée :

L'évolution de l'azote total et de l'azote non protéique est montrée dans le tableau 15. On constate une forte augmentation de ces matières au cours de la conservation. La température et la concentration des saumures ont une grande influence sur leur enrichissement en matière azotée. On trouve 3,12 ; 1,95 et 1,45 g d'azote dans la saumure à 18 %, respectivement pour les températures 20°, 10° et 5°C. Dans la saumure à 15 % de sel, et pour les mêmes températures, le taux d'azote est 2,53 ; 1,43 et 1,1 g par litre.

Tableau 15

Evolution de la matière azotée dans les saumures

Période de la conser- vation: Jours	Saumure à 15 %						Saumure à 18 %					
	5°C			10°C			5°C			10°C		
	N.T.	N.P.N.	N.T.	N.P.N.	N.T.	N.P.N.	N.T.	N.P.N.	N.T.	N.P.N.	N.T.	N.P.N.
1	0,07	0,06 (85,7)	0,10	0,085 (85)	0,17	0,14 (82,3)	0,10	0,09 (90,0)	0,15	0,13 (86,6)	0,19	0,15 (79,0)
15	0,25	0,21	0,35	0,29	0,52	0,43	0,45	0,41	0,62	0,53	0,85	0,78
30	0,41	0,33	0,55	0,47	0,95	0,80	0,61	0,55	0,83	0,74	1,16	1,05
60	0,86	0,70	0,94	0,85	1,53	1,40	1,15	1,05	1,30	1,16	1,98	1,75
90	1,01	0,88	1,15	1,05	2,25	2,05	1,27	1,16	1,48	1,33	2,57	2,41
120	1,1	1,00 (90,9)	1,43	1,29 (90,2)	2,53	2,32 (91,7)	1,45	1,32 (91,03)	1,95	1,75 (89,7)	3,12	3,01 (96,5)

(...) Azote non protéique % de l'azote total

N.T. = Azote total. (g/l)

N.P.N. = Azote non protéique (g/l)

Le taux de l'azote non protéique est toujours extrêmement élevé dans la saumure filtrée. Il augmente au cours du salage ; à la fin de la conservation. Ce taux le plus élevé de N. P. N. est obtenu avec la saumure à 18 % et 20°C.

3. 2. 5. - Identification et dosage des acides aminés libres dans la saumure :

Nous avons procédé comme dans le cas du fromage ; une identification des acides aminés présents a été faite par chromatographie sur papier à deux dimensions. Tous les acides aminés ont été nettement décelés, à l'exception de la proline dont la présence est douteuse.

Ensuite, nous avons dosé quantitativement les acides aminés libres. Dans le tableau 16, les résultats sont exprimés en p. 100 du total et en mg par litre de saumure. En tenant compte du fait que 2 L de saumure ont servi à saler 1 Kg de fromage, on constate que la saumure contient 2,3 fois plus d'acides aminés libres que le fromage correspondant (2,885 g contre 1,235 g).

En ce qui concerne la composition en acides aminés, exprimée en p. 100 des acides totaux, (tableau 16 et fig. 13), on trouve que les plus abondants : lysine, leucine et valine représentent près de 50 %. Ensuite on trouve 8 acides aminés en proportion comprise entre 4 et 8 % (Phe, Arg, Tyr, Glu, Ile, His, Cys et Pro). Les acides aminés (Met, Thr, Ala, Asp, Ser, Gly) ne se trouvent qu'en faible proportion.

En comparant ce résultat avec celui du fromage salé ; on voit que la saumure à une teneur plus élevée en acide aspartique, thréonine, acide glutamique, proline, cystine, méthionine et arginine ; par contre elle contient moins de serine, de valine, de leucine, de phénylalanine, de lysine et d'histidine. La teneur de la saumure en glycine, alanine et isoleucine est comparable à celle du fromage.

Tableau 16

Composition en acides aminés libres de la saumure
à 18 %, conservée à 10°C, pendant 180 jours.

Acides aminés	A. A. % des acides totaux	mg/l
Acide aspartique	0,97	14,04
Thréonine	1,3	18,62
Sérine	0,35	5,02
Acide glutamique	6,05	87,23
Proline	4,55	65,62
Glycine	0,32	4,7
Alanine	1,22	17,6
Valine	10,53	151,92
Cystine	4,62	66,78
Méthionine	3,46	49,93
Isoleucine	5,42	78,31
Leucine	15,01	217,5
Tyrosine	5,63	81,25
Phénylalanine	7,71	111,82
Lysine	21,14	305,01
Histidine	5,13	73,98
Arginine	6,46	93,3
Total A. A. totaux	-	1 442,63
Total A. A. totaux cor- respondant à 1 Kg de fromage (2 l saumure)		2 885,26

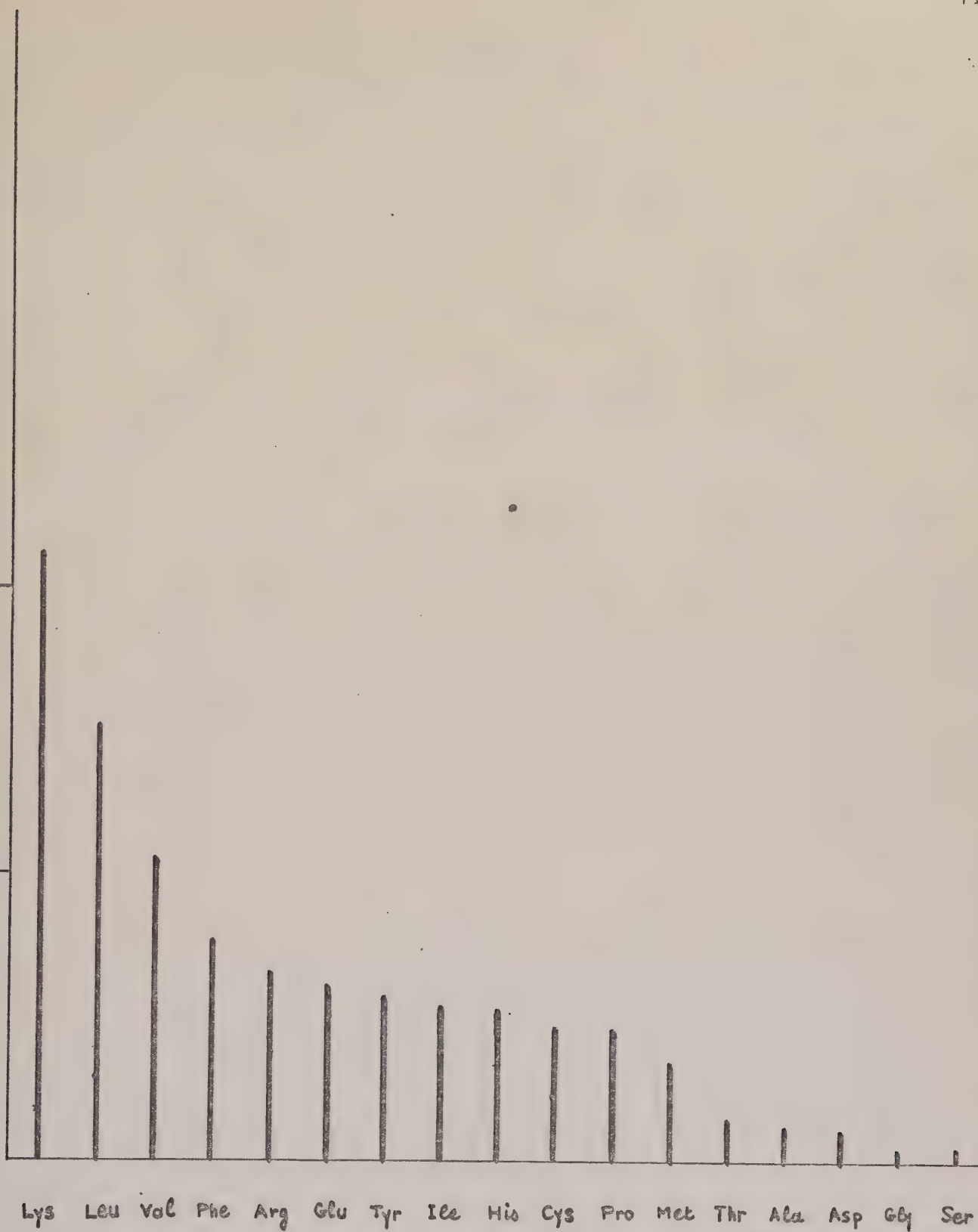


Fig. 13. - Représentation schématique de la composition en acides aminés libres de la saumure.

3.3. - Etude microbiologique :

3.3.1. - Evolution de la flore totale :

Nous avons effectué des numérations, sur les fromages avant et après présalage et ensuite régulièrement au cours de la conservation. Le tableau 17 montre que le nombre des germes totaux diminue après le présalage d'environ 3,5 fois. Cette diminution se poursuit rapidement au début de la conservation en saumure. On trouve, après 18 jours, 35 millions de germes ; ensuite, cette flore varie très peu jusqu'au 60ème jour, à partir duquel elle recommence à décroître, régulièrement jusqu'à la fin. (fig. 14).

Quant au fromage emballé sous "Cryovac", sa flore totale augmente d'abord sensiblement ; après trois jours, le nombre de germes est passé de 150 millions à 240 millions puis elle subit une décroissance rapide jusqu'au 18ème jour, ensuite elle augmente de nouveau. Entre le 25ème et le 40ème jour, elle se stabilise avant de recommencer à décroître. A la fin de la conservation, on trouve que la flore totale du fromage sous Cryovac est supérieure à celle du fromage en saumure, 15 millions de germes dans le premier contre 5,6 millions dans le deuxième

Nous avons également suivi l'évolution de la flore totale de la saumure qui est le milieu de conservation. On voit d'après la figure 14 que le nombre des germes contrairement aux fromages, augmente dès le début jusqu'au 18ème jour, ensuite il décroît régulièrement. Nous avons remarqué que l'évolution de la flore totale de la saumure va parallèlement avec celle des levures qui constituent comme nous verrons plus loin la flore dominante.

Tableau 17

Microflore du caillé (germes par grammes)

	Microflore totale	Streptocoques lactiques	Levures	Bactéries coliformes
Avant salage	$5,1 \times 10^8$	4×10^8	40	0
Après présalage	$1,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	30	0

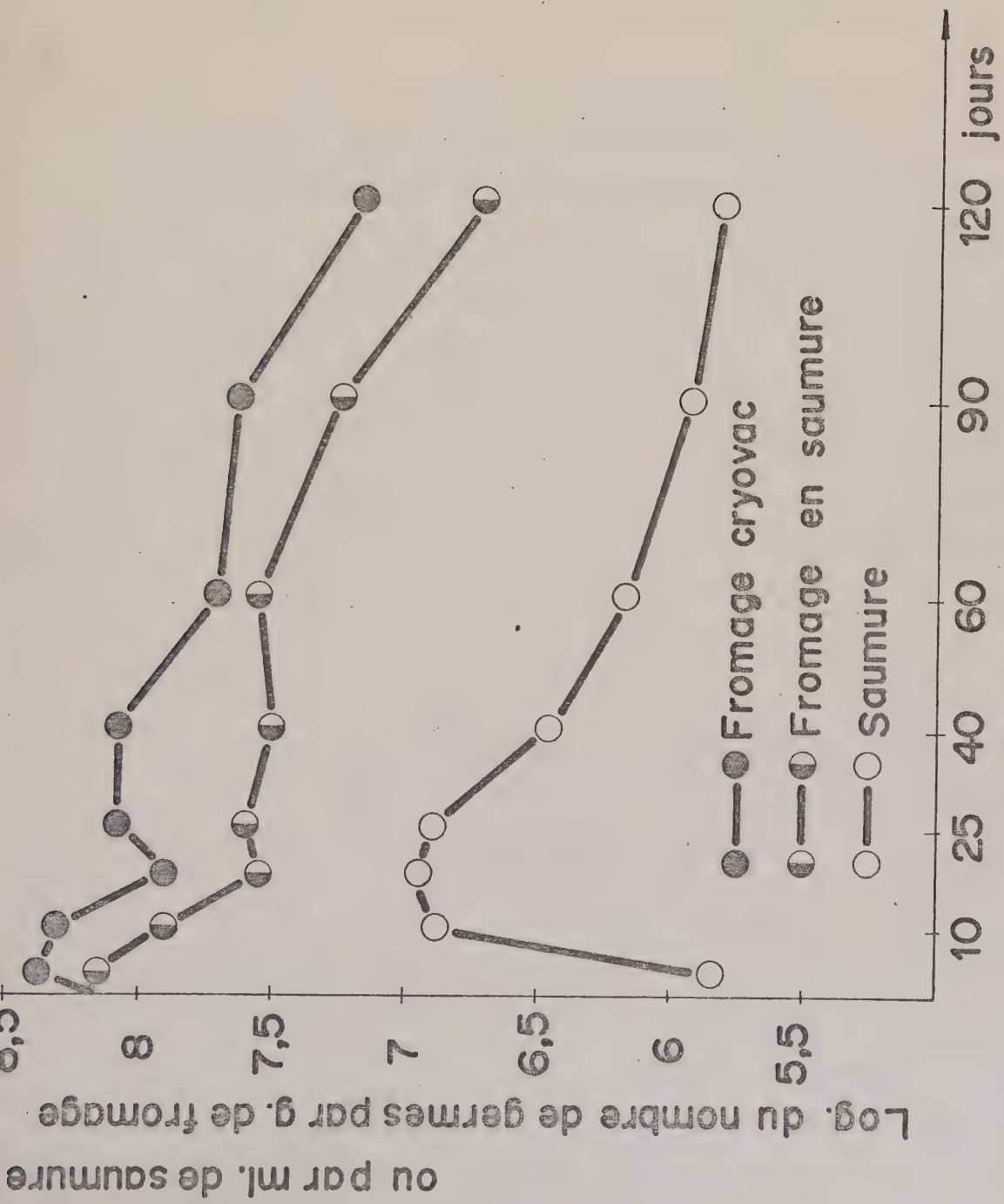


Fig. 14. - Evolution de la flore totale.

3.3.2. - Evolution de la flore lactique :

Le fromage est fabriqué à partir de lait pasteurisé auquel on ajoute des cultures de Streptocoques lactiques. Cela explique le nombre élevé des bactéries lactiques trouvé dans le fromage au début de la conservation, en utilisant le milieu ELLIKER et coll. (28). On trouve d'après le tableau 17, 250 millions de Streptocoques lactiques contre 150 millions de germes totaux, mais ensuite cette flore subit une forte décroissance. La vitesse de la destruction est supérieure dans le fromage salé à celle du fromage Cryovac. On arrive à la fin de la conservation à une disparition presque totale de cette flore lactique, figure 15.

Dans la saumure, on en trouve dès le début quelques milliers, mais ensuite ces bactéries disparaissent très vite ; à la fin, on en trouve une cinquantaine qui survivent dans ce milieu salé.

L'évolution du pH et de l'acidité lactique ont été suivies parallèlement à celle de la flore lactique. La figure 16 montre que l'acidité augmente régulièrement dans le fromage Cryovac et dans la saumure par contre la flore lactique subit dès le début une destruction très forte. En même temps, on constate la disparition du lactose notamment dans les fromages comme le montrent les courbes de la figure 17. Il est vraisemblable que le lactose est fermenté non seulement par les bactéries lactiques, mais aussi par d'autres microorganismes.

Nous avons cherché les lactobacilles sur le milieu M. R. S. mais nous n'avons pas mis en évidence leur présence, ni dans les fromages, ni dans la saumure. Cela nous apparaît normal car les ferments ajoutés au lait étaient exempts de ces genres de bactéries lactiques.

3.3.3. - Recherche des coliformes :

La présence des coliformes dans les produits laitiers a pour origine une contamination fécale ; elle n'est pas rare dans les laits récoltés et traités dans des conditions défavorables au point de vue de l'hygiène. Nous avons cherché ces bactéries sur le milieu lactosé biliaire au vert brillant. Les résultats obtenus montrent toujours leur absence au cours de la conservation. Il est possible que la concentration élevée du sel et l'acidification de produits analysés ont joué le rôle d'inhibiteur de ce genre de bactéries.

Fig. 15. - Evolution des Streptocoques lactiques.

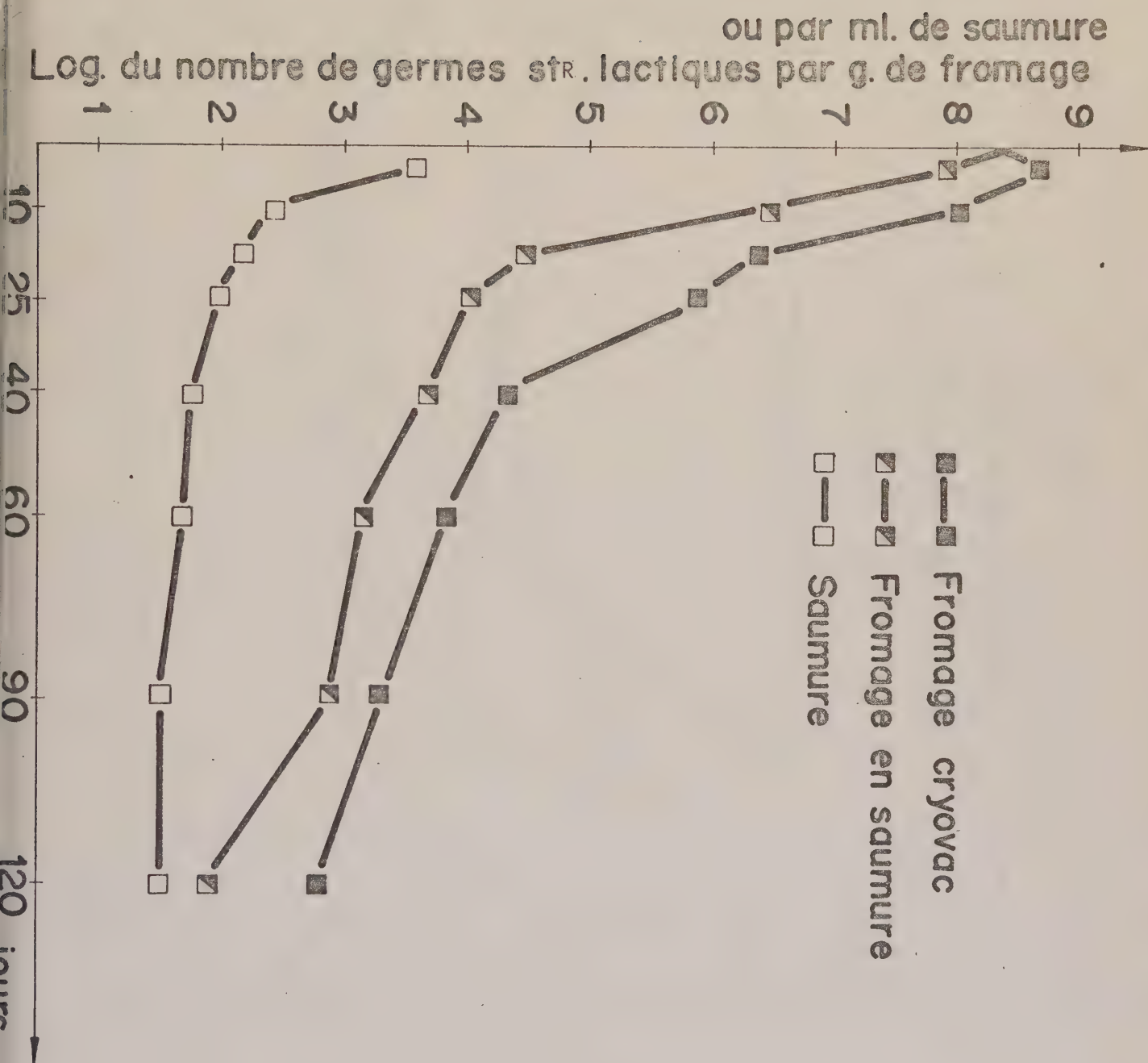


Fig. 16. - Evolution du pH et de l'acidité.

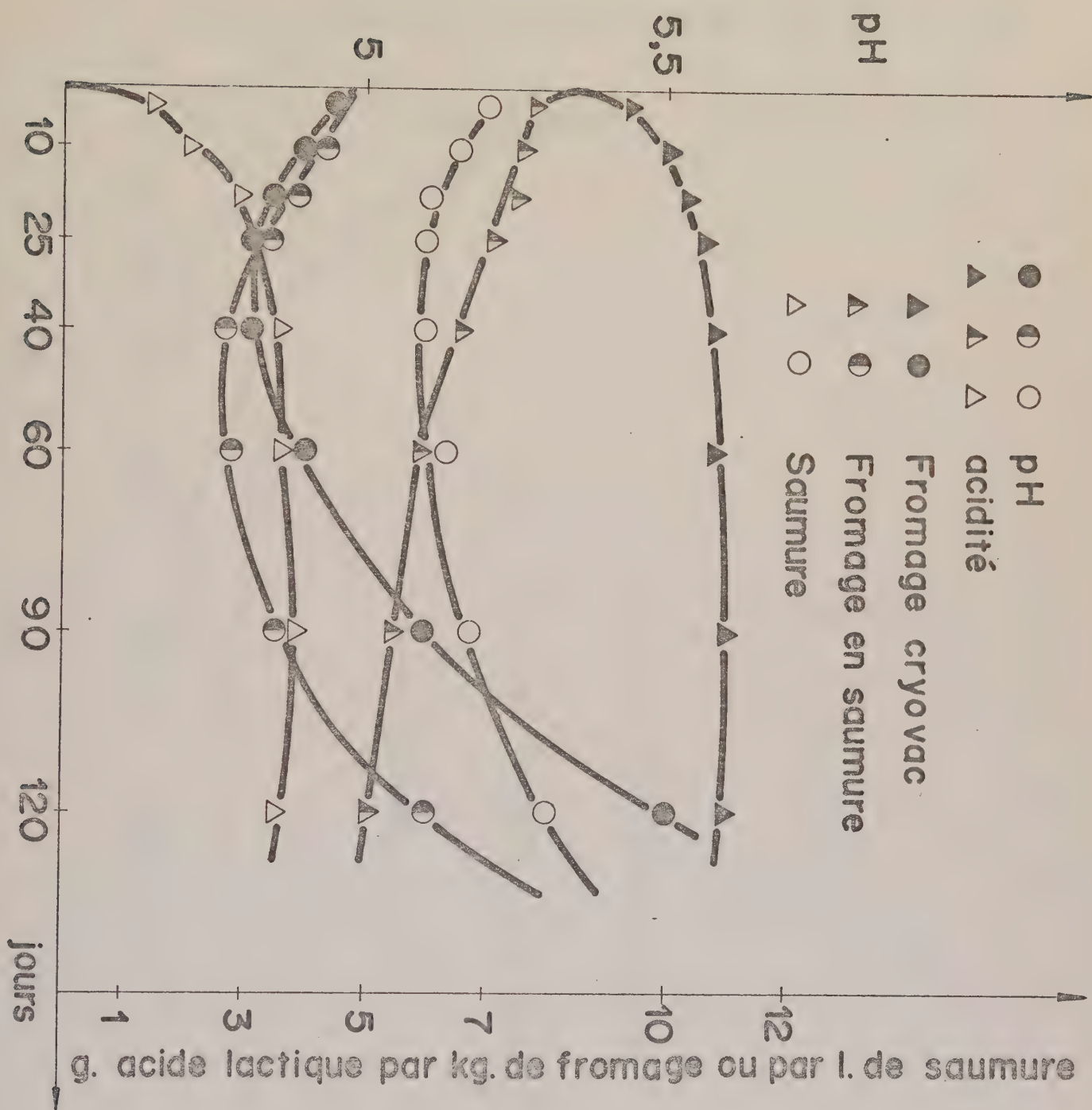
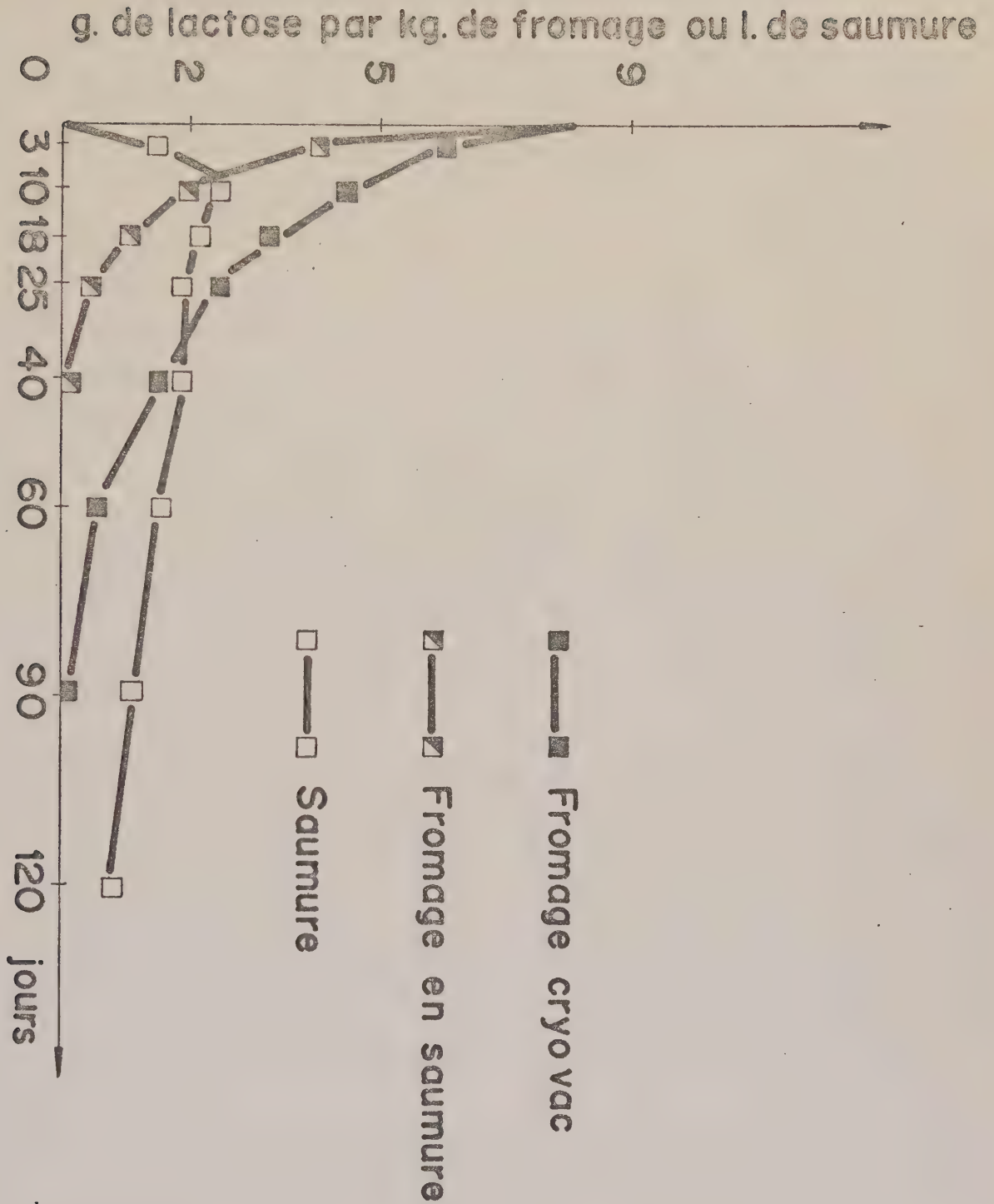


Fig. 17. - Evolution du lactose.



3.3.4. - Evolution des levures et des moisissures.

Au début de la conservation, on trouve très peu de levures, tableau 17. Ensuite leur nombre augmente très rapidement pendant les 10 jours qui suivent la fabrication. On trouve alors dans le fromage sous Cryovac 30 millions de levures. Dans le cas du fromage en saumure, cette augmentation continue jusqu'au 18ème jour, figure 18, où l'on arrive à en trouver un nombre 2,3 fois plus élevé que le précédent. Dans la saumure elle-même, on obtient le nombre maximal qu'au 25ème jour. Après cette période de croissance, on constate que le nombre des levures commence à diminuer dans tous les cas, mais la décroissance est plus rapide dans le fromage sous Cryovac que dans le fromage salé, ou dans la saumure. A partir du 60ème jour, le nombre de levures varie peu ; jusqu'à la fin de la conservation, on en trouve un nombre supérieur dans la saumure et dans le fromage salé par rapport au fromage sous Cryovac ; respectivement : 650 000 ; 260 000 et 60 000 levures.

Nous avons également compté les moisissures, en utilisant le même milieu que celui utilisé pour les levures ; leur nombre trouvé au cours de la conservation était toujours inférieur à 100 par gramme de fromage au 1 ml de saumure. Il est certain que les conditions de la conservation n'étaient pas favorables à leur croissance. Par contre, nous avons remarqué que les moisissures s'étaient développées, à la fin de la conservation sur l'emballage Cryovac du côté de la fermeture.

3.3.5. - Identification des levures survivantes dans la saumure :

Le nombre élevé des levures dans la saumure concentrée (18 % de sel) nous a conduit à faire une étude d'identification de genre de levures qui peuvent se multiplier dans ce milieu salé.

Neuf souches de levures ont été isolées à partir de la saumure, ayant quatre mois d'utilisation. Huit souches de ces levures possèdent la propriété de former des ascospores ; les cellules sont petites et ont une forme ronde ou légèrement ovale, comme le montre

Fig. 18. - Evolution des Levures

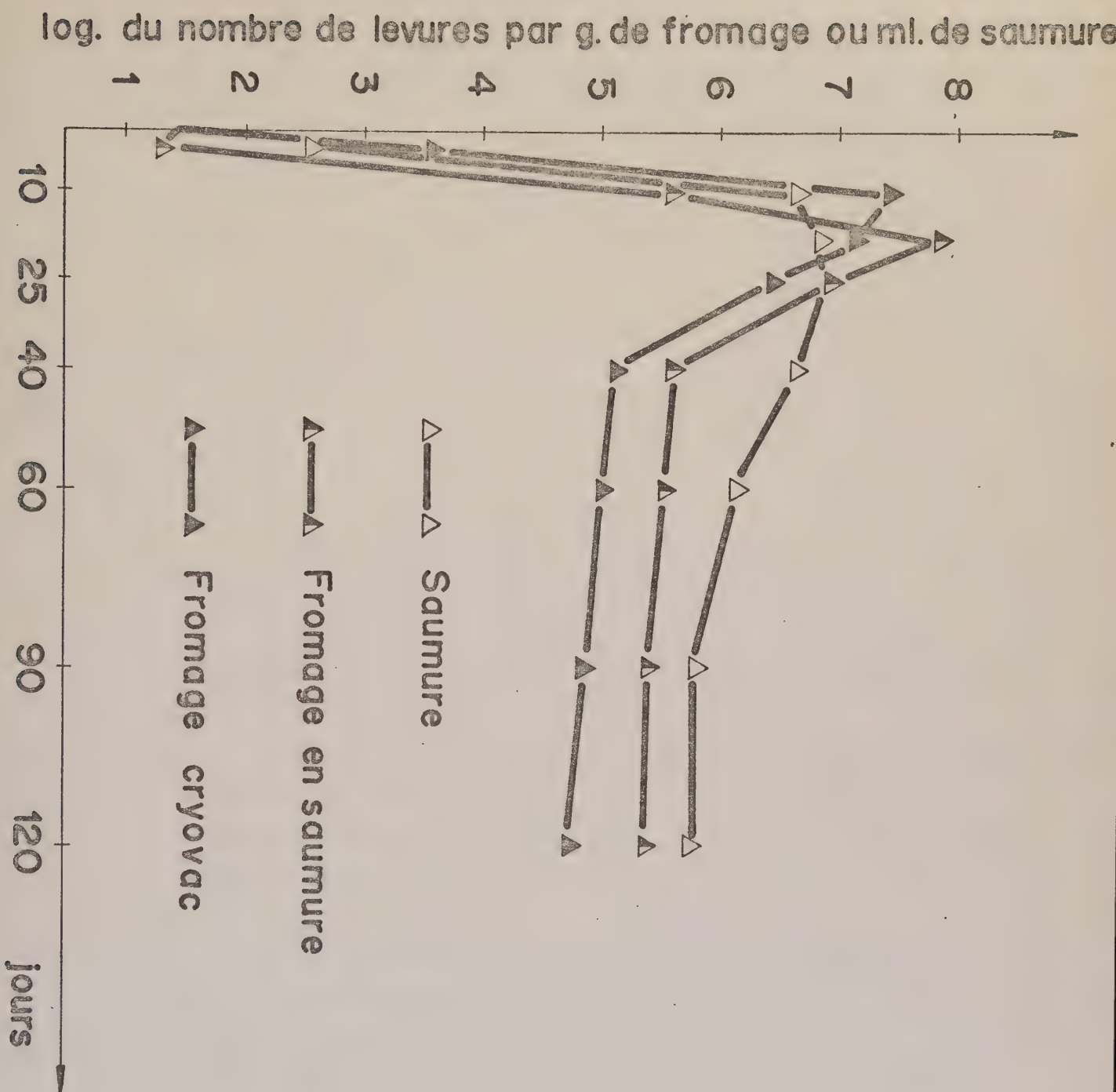


Fig. 19. - *Deb. hansenii*, après 3 jours dans l'extrait de malt.

Dans le tableau 18, nous avons regroupé les principaux caractères de ces levures. En suivant la classification proposée par LODDER et KREEGER Van RIJ (62), nous pouvons considérer ces souches comme appartenant au genre *Debaryomyces*.

Elles fermentent très faiblement le glucose, le galactose, et le saccharose ; elles assimilent le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose et le lactose ; mais elles n'assimilent pas les nitrates ; elles forment rapidement des pellicules sur le milieu liquide.

D'après ces propriétés morphologiques et physiologiques, il est probable qu'il s'agisse de l'espèce *D. hansenii*, appelée déjà *D. subglobosus* (Zach).

L'étude que nous avons faite sur la neuvième souche ne nous permet pas de la classer. Les résultats obtenus sont trop fragmentaires.

Tableau 18

Principaux caractères des levures isolées de la saumure

Forme des cellules		rondes et petites	rondes et légèrement ovales	ovales.
Reproduction végétative		bourgeonnement	bourgeonnement	bourgeonnement
Formation de pseudo-mycelium		-	-	-
Formation de pellicule sur milieu liquide		++	++	++
Aspect de la culture sur milieu gélosé.		non pigmenté	non pigmenté	non pigmenté
Sporulation		++	+	-
Fermentation des sucres	Glu	+ faible	+ très faible	+
	Gal	+ très faible	+ "	-
	Sac	+ très faible	+ "	-
	Mal	-	-	-
	Lac	-	-	-
Assimilation des sucres	Glu	+	+	+
	Gal	+	+	-
	Sac	+	+	-
	Mal	+	+	-
	Lac	+	+	-
Assimilation des nitrates		-	-	-
Nombre de souches isolées		6	2	1

Glu : glucose ; Gal : galactose ; Sac : saccharose ; Mal : maltose ; Lac : lactose.

IV - DISCUSSION

4. 1. - Aspects physico-chimiques :

L'acidification lactique, aux dépens du lactose, se produit dans le fromage conservé en saumure, comme dans le fromage affiné hors saumure, mais l'évolution du pH et de l'acidité de titration révèle des différences. Dans le second cas, au début de l'affinage, le pH diminue et l'acidité augmente ; l'acide lactique formé reste dans la pâte. Dans le fromage conservé en saumure, la baisse du pH est limitée, mais en même temps l'acidité décroît ; dans ce procédé, l'acide lactique ne s'accumule pas dans la pâte; il y a un passage continu dans la saumure et il y a un plus fort drainage, que met en évidence la réduction notable de l'extrait sec. Avec un fromage différent du notre, le "Telemea", MANOLKIDIS et coll. (63) ont également observé que l'acidité ne baisse que si le fromage est conservé en saumure.

L'influence de la température et de la concentration de la saumure sur l'évolution du pH et de l'acidité est sensible au-delà d'un mois de conservation. La remontée du pH est proportionnelle à la température ; ceci correspond à un taux de maturation plus élevé à 20°, qu'à 10° ou à 5°C.

Dans les saumures, le pH subit une évolution comparable à celle du fromage, mais il est toujours plus élevé dans la saumure, qui est un milieu peu tamponné, du moins au début. Des résultats comparables ont été obtenus par CHKHAIDZE (18) avec le fromage "Tushinsky". Par contre l'acidité de la saumure, évolue d'une manière opposée à celle du fromage ; le passage rapide de l'acide lactique dans la saumure se traduit par une augmentation immédiate et importante de l'acidité de titration. La décroissance de l'acidité, qui se produit plus tard

(après 2 mois) dans la saumure la moins concentrée (15 % de sel) à 10° et 20°C, est probablement la conséquence de l'activité de micro-organismes consommant l'acide lactique ; cette microflore est moins active avec 18 % de sel.

4.2. - Equilibres minéraux :

Le séjour en saumure provoque un appauvrissement du fromage en minéraux, sauf évidemment en chlorure de sodium. Pour le calcium et le phosphore, JAKUBOWSKI et REPS (40) ont aussi observé une baisse de la teneur en ces éléments au cours du salage du fromage de "Tilsit". Par contre, SHARARA (80) a obtenu des résultats différents avec le fromage "Domiaty" ; mais ce fromage a une mode de fabrication particulier, il est obtenu par coagulation du lait fortement salé et les échanges de minéraux avec la saumure doivent être plus limités.

En ce qui concerne le potassium et le magnésium, constituants de la phase aqueuse du fromage, nous avons observé une migration totale dans la saumure, résultat qui ne concorde pas, pour le potassium, avec celui de JAKUBOWSKI et REPS (40) ; nous ne pouvons expliquer cette contradiction.

Evidemment, la saumure s'enrichit en minéraux aux dépens du fromage, mais le fromage retient relativement plus les phosphates que le calcium. Le tableau 19 montre les pertes de un Kg de fromage dans la saumure. Pour le calcium, les pertes sont plus élevées dans la saumure à 18 % que dans celle à 15 % ; pour les autres éléments ; il y a peu de différence. A 20°C, les pertes sont plus élevées qu'à 10° ou à 5°C.

Tableau 19

Passage des minéraux d'un Kg de fromage,
dans la saumure, après 120 jours de conservation (g)

concentration de la saumure %	Température de la conservation	Ca	P	K	Mg
15	5°C	2,50	1,00	1,04	0,12
15	10°C	2,62	1,12	1,20	0,12
15	20°C	2,76	1,20	1,24	0,12
18	5°C	2,70	1,10	1,02	0,12
18	10°C	2,68	1,10	1,12	0,12
18	20°C	2,86	1,22	1,26	0,12

Le tableau 20 montre que le fromage conservé à 10 °C sous le film Cryovac retient beaucoup plus les minéraux que le fromage en saumure.

Le rapport Ca/P est une caractéristique spécifique de chaque type de fromage (61,76). Dans les fromages conservés en saumure, il oscille entre 1,0 et 1,1 ; il est sensiblement plus élevé dans le fromage affiné hors saumure.

Tableau 20

(1) Le taux des minéraux retenu dans les fromages
(en %)

	Conservation en saumure à 15 %			Conservation en saumure à 18 %			Emballage "Cryovac"
	5°C	10°C	20°C	5°C	10°C	20°C	
Ca	49,4	46,6	40,9	49,6	46,2	36,72	70,8
P	55,9	57,4	51,9	54,9	52,8	45,1	75,8
K	3,3	0	0	0	0	0	11,4
Mg	0	0	0	0	0	0	17,4
Ca/P	1,12	1,03	1,0	1,14	1,08	1,03	1,23

(1) $\frac{\text{Quantité d'élément dans le lait avant l'emprésurage}}{\text{Quantité de même élément dans le fromage}} \times 100$

4. 3. - Diffusion du sel :

Les facteurs agissant sur la diffusion du sel dans le fromage sont en général : la concentration de la saumure, la teneur du fromage en eau, la durée de salage, la surface relative du fromage et la température de salage.

Les résultats que nous avons obtenus au début du salage vont dans le même sens que ceux d'autres auteurs qui ont étudié la cinétique du salage et que nous avons précédemment signalés (66) ; ils concordent en particulier avec ceux de BREENE et coll. (14), cependant la prolongation du salage donne des résultats divergents ; la teneur en sel dans le fromage est la plus élevée dans la saumure la moins forte (15 %) et à plus basse température (5°C). Il est certain que l'humidité du fromage joue un rôle dominant dans la diffusion du sel. Quand l'humidité est la même (cas du fromage frais), la vitesse d'absorption du sel dépend de la température ; mais à plus haute température, le drainage est plus rapide et la diffusion de sel se ralentit ; en outre, l'augmentation de la concentration de la saumure, et de la température du saumurage, favorise la formation d'une croûte plus solide, en conséquence la pénétration du sel est freinée.

Si on exprime la teneur en sel en p. 100 de l'eau totale du fromage, on constate que cette valeur est presque la même à la fin de la conservation pour les fromages de chaque série, autour de 14,4 % pour la saumure à 15 % de sel et autour de 15,6 % pour la saumure à 18 % de sel. La phase aqueuse du fromage et la saumure, compte tenu de la dilution de cette dernière et de l'existence d'eau liée dans le fromage, doivent avoir à ce moment la même concentration en substances solubles totales, donc la même pression osmotique.

Bien que le fromage plongé dans la saumure ne puisse être assimilé à un milieu aqueux limité par une membrane semi-perméable, il est certain que l'équilibre osmotique joue un rôle majeur dans

les échanges d'eau et de sel entre les deux milieux. Récemment, ZONJI (97) a fait une étude mathématique de la diffusion du sel dans le fromage et de la perte d'eau par ce dernier ; elle confirme que cette perte dépend de la pression osmotique de la phase aqueuse du fromage.

La reprise d'eau par le fromage conservé dans la saumure à 15 % et aux températures de 5° et 10°C ne peut être expliqué que par un rétablissement de l'équilibre osmotique ; car dans ces conditions, l'absorption du sel par le fromage est rapide.

Pour les différentes saumures étudiées, nous constatons que la perte en sel est proportionnelle, au début du saumurage, à la température et à la concentration des saumures mais à la fin du saumurage, on observe une perte plus importante pour la saumure à 15 % que pour celle à 18 %.

Nous avons calculé la perte en sel des saumures due à un Kg du fromage (S) et nous avons cherché la teneur en sel dans le fromage (F), après avoir soustrait la quantité du sel absorbée au cours du présalage (tableau 21). Les moyennes obtenues : $S = 45,6$ g et $F = 48,4$ g sont comparables. Ensuite, nous avons calculé le coefficient de corrélation, entre les deux analyses, il est égal à 0,61 ; donc il y a une corrélation positive entre ces deux résultats. La droite de régression est présentée dans la figure 20. Elle permet de calculer la teneur en sel dans le fromage ou dans la saumure, en la connaissant dans l'un ou dans l'autre de ces milieux. La formule correspondante est

$$Y = 1,12 X - 8,5$$

Tableau 21

Perte en sel de la saumure due à 1 Kg de fromage (1)

S	F	S	F
29,2	38,1	30,8	44,6
52,4	46,6	42,6	40,7
54,0	48,6	57,0	54,7
54,2	49,7	57,2	58,6
53,8	51,6	20,4	32,6
42,8	41,6	41,8	57,6
49,4	48,3	59,6	58,6
49,6	48,6	49,0	60,6
29,2	47,3	35,4	39,6
49,0	47,6	43,0	46,6
48,4	50,6	45,0	48,6
53,6	51,6	29,6	37,6
56,4	57,6	39,2	47,1
23,0	33,6	47,4	52,7
55,0	54,8		

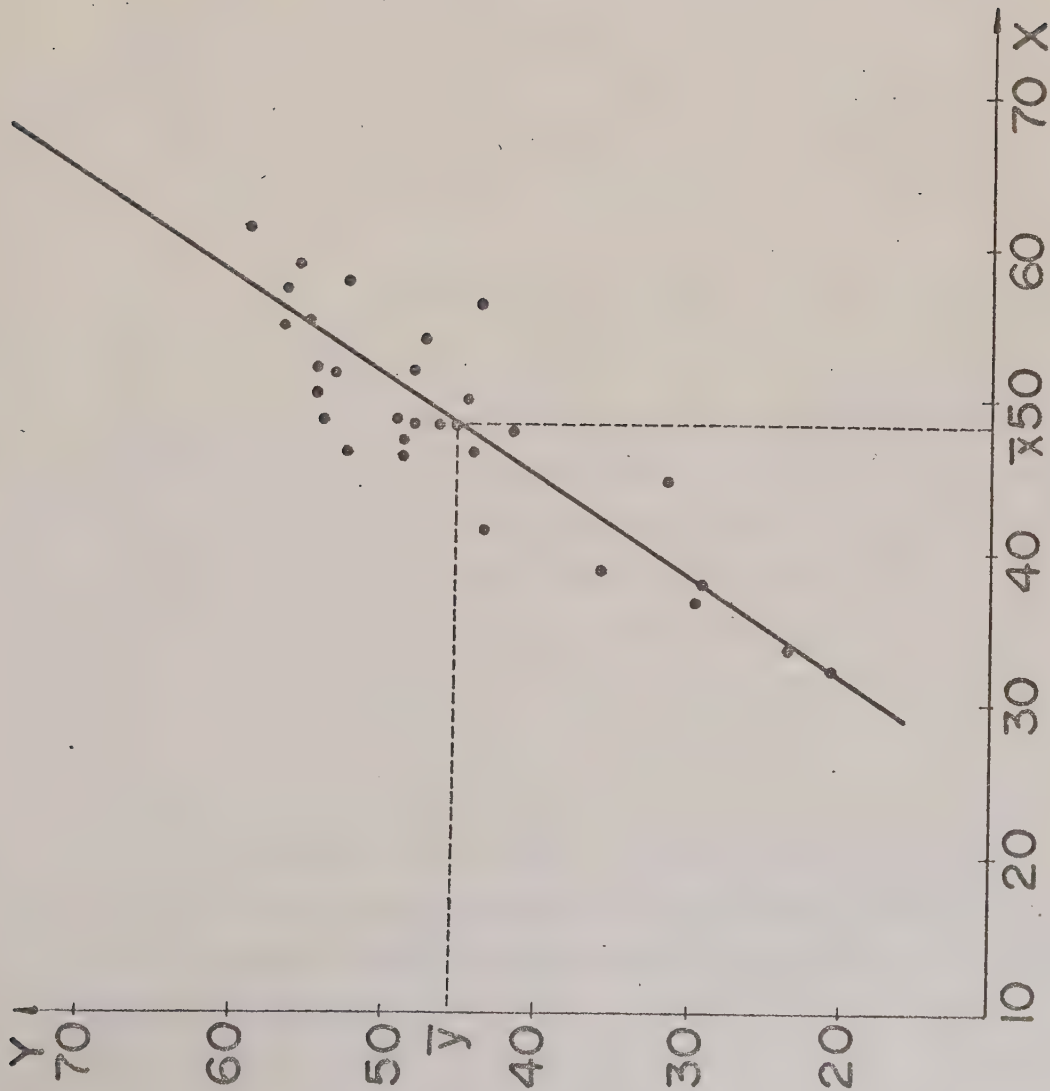
(1) S = perte en NaCl de la saumure, en gramme, due à 1 Kg de fromage.

F = g/NaCl trouvés dans 1 Kg de fromage.

Fig. 20. - Droite de régression

Y = perte en sel de la saumure due à 1 Kg de fromage

X = g, de sel trouvés dans 1 Kg de fromage.



4.4. - Aspects biochimiques :

L'arôme et la texture caractéristique d'un fromage résultent de modifications importantes concernant les glucides, lipides et protides. L'ensemble de ces modifications dépend des conditions physiques et chimiques qui influent sur le développement des micro-organismes et sur l'activité enzymatique. Ces phénomènes et notamment la dégradation des protéines, ont occupé une grande partie de notre travail.

4.4.1. - Protéolyse :

En général, on mesure le degré de protéolyse par la proportion de l'azote soluble (N. S.) dans l'azote total (N. T.). En comparant des méthodes analytiques utilisées en pratique, nous avons constaté qu'on obtient un taux d'azote plus élevé avec la suspension du fromage dans le citrate de soude qu'avec l'extraction à l'eau chaude à condition que le pH des deux filtrats d'extraction soit égal à 4,4. Nous avons donc choisi la première méthode.

L'étude de la corrélation, entre la teneur en azote soluble et la densité optique du filtrat du fromage, à 274 nm, a montré que cette dernière peut être recommandée, grâce à sa rapidité et à sa simplicité, pour les dosages en série. Il est probable que le coefficient "r" doit varier selon le mode d'affinage, car l'absorption à 274,5 nm est un dosage indirect de la tyrosine soluble. VAKALERIS et PRICE (88) ont trouvé $r = 0,958$ pour le fromage de "Cheddar". Par contre dans le cas du fromage affiné en saumure, nous avons trouvé que "r" est égal à 0,80.

La protéolyse est fortement ralentie par une teneur en sel élevée dans le fromage conservé et affiné en saumure ; la température de la conservation a ici un rôle capital ; le fromage affiné sous Cryovac a un rapport de maturation beaucoup plus élevé que celui du fromage en saumure.

En ce qui concerne l'azote non protéique (NPN), nous avons constaté qu'il y a peu de changement dans la part qu'il représente dans la matière azotée soluble, au cours de la conservation en saumure. Cela est dû certainement à une déperdition des petites molécules azotées (peptides, acides aminés, ammoniacque) dans la saumure ; fait que nous avons vérifié par la suite, ce qui contribue à diminuer les coefficients de maturation et de rendement. Non seulement, l'affinage dans ce type de fromage se distingue de celui des fromages affinés en cave (57) par une protéolyse très limitée, mais encore la marche de cette protéolyse doit se faire d'une manière différente.

L'étude de la dégradation des protéines, dans le fromage conservé en saumure, par la méthode électrophorétique a montré que les caséines α_s et K ont subi une dégradation plus importante que la caséine β , qui est presque inattaquable en présence de la forte teneur en sel dans le fromage. Ce résultat concorde avec celui de FOX et WALLEY (34) qui ont observé que la protéolyse de la caséine était complètement inhibée en présence de 10 % de sel ; alors que la protéolyse de la caséine α_s était maximale en présence de 5 à 10 % de sel. Egalement, dans le cas du Cheddar, LEDFORD et coll. (56) ont observé des différences du même genre. Dans le cas du fromage Domiati ABDEL-SALAM et EL-SHIBINY (1) ont trouvé que la caséine β est divisée en deux bandes dès le début de l'affinage, mais ensuite elle reste stable au cours de la conservation.

En comparant les diagrammes d'électrophorèse de différentes sortes de fromages français et étrangers, avec le fromage conservé et affiné en saumure (1, 13, 26, 56, 67, 71, 73) nous constatons que leurs caséines sont hydrolysées dans des proportions différentes suivant la variété de fromage. Celà est dû aux conditions de fabrication.

Le fromage affiné en saumure est caractérisé non seulement par une protéolyse très limitée, mais encore par sa composition en acides aminés libres. En comparant les résultats que nous avons obtenus avec ceux de DONGOC et coll. (25) et concernant les fromages français de type Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté, on constate que le fromage affiné en saumure contient très peu d'acides aminés libres. Ces auteurs ont trouvé 10,7 g, 6,2 g et 31,6 g par Kg respectivement pour les trois espèces ci-dessus ; par contre, nous avons trouvé 1,23 g et 3,7 g par Kg, respectivement pour le fromage conservé en saumure et celui emballé sous Cryovac.

En outre, les proportions de chacun des acides aminés libres de ce genre de fromage comparées à celles d'autres fromages étrangers (4, 6, 10, 50, 51, 77) montrent une variation sensible d'un type de fromage à l'autre. C'est une conséquence de la diversité des actions enzymatiques qui se manifestent dans le fromage au cours de l'affinage.

La saumure s'enrichit fortement en acides aminés libres. Cela ne tient pas seulement au passage continu du lactosérum et des produits de la dégradation des protéines du fromage dans la saumure, mais aussi à une action microbienne qui peut provoquer des dégradations secondaires au sein de la saumure. A la fin de la conservation, on trouve que 1 Kg de fromage apporte 2,88 g d'acides aminés dans la saumure.

4.4.2. - Lipolyse :

La lipolyse n'est pas du tout freinée par la teneur élevée en sel. A la même température de conservation, le degré de lipolyse est plus élevé dans le fromage affiné en saumure que dans l'autre fromage. La destruction de la lipase du lait est rapide au-dessus de 60°C, par contre les lipases qui sont produites par les microorganismes peuvent être plus résistantes à la chaleur. STADHOUDERS (84, 85) a mis en évidence des lipases thermorésistantes lors de la fabrication du fromage qui est fabriqué à partir du lait pasteurisé à 74°C. Il est probable

que dans notre fromage, qui est fabriqué à partir du lait pasteurisé à 75°C, les lipases sont d'origine microbiennes. La flore microbienne a certainement un rôle dominant dans la lipolyse et elle n'est pas la même dans le fromage conservé en saumure, qui est riche en levures, que dans celui emballé sous "Cryovac". Ce dernier a un taux d'acidité lactique trois fois plus grand que celui du fromage salé en saumure. Cette acidité relativement élevée peut inhiber certaines espèces et ralentir la lipolyse dans le fromage emballé de cette manière. Le rôle inhibiteur de l'acidité a été signalé par EFTHYMIOU (27) pour le fromage "Feta".

En outre, STADHOUDER (86) d'une part et GOULD (38) d'autre part, ont trouvé que la lipolyse était accélérée en augmentant le taux de sel dans le fromage. Par contre, WILLART et SJOSTROM (95) ont trouvé que la quantité croissante de sel provoque une diminution de la libération des acides gras de la matière grasse du fromage.

4. 5. - Aspects microbiologiques :

La flore microbienne est constituée essentiellement, au début de la fabrication, par des streptocoques lactiques ajoutés au lait pasteurisé avant l'emprésurage. Cela explique le nombre plus élevé de bactéries lactiques dénombrées sur le milieu spécial de ELLIKER et coll. (28), au début de la conservation, par rapport à la flore totale. Ce milieu qui n'est pas très spécifique, contient les éléments nécessaires pour le développement d'une large variété microbienne.

Au cours de l'affinage du fromage, nous constatons que la flore lactique subit une destruction rapide et presque totale. Ce résultat est opposé à ce qui se passe dans d'autres fromages. DEVOYOD et coll. (21) pour le fromage de Roquefort, ont trouvé que les streptocoques lactiques forment toujours la flore dominante tout au long de l'affinage.

Il est certain que la forte teneur en sel dans le fromage conservé en saumure, et le taux d'acidité lactique élevé dans le fromage conservé sous "Cryovac" ont été défavorables à la flore lactique.

La destruction de la flore lactique, au cours de l'affinage, a pour conséquence une baisse de la population totale, cependant nous constatons que la flore totale remonte sensiblement entre le 18ème et le 40ème jour dans le fromage conservé sous "Cryovac" et elle se stabilise dans le cas du fromage conservé en saumure. Cette évolution est due à l'apparition des autres groupes microbiens.

En ce qui concerne l'évolution de la flore totale de la saumure, nous constatons que celle-ci est liée à celle des levures qui se trouvent en flore dominante à partir du 10ème jour de conservation. On trouve que les levures représentent 93 % de la flore totale à la fin de l'affinage. Dans un fromage affiné en saumure les levures se développent également très vite.

L'étude que nous avons faite pour identifier les levures halophiles, survivant dans la saumure, nous a montré que celles-ci appartiennent au genre *Debaryomyces*, qui n'est pas capable de fermenter le lactose. En conséquence, l'altération du produit n'a pas eu lieu au cours de l'affinage en saumure. Des levures de ce genre ont été retrouvées dans le fromage "Domiat" (36) qui est un bon exemple de fromage blanc salé et affiné en saumure. DEVOYOD ET Coll. (22) l'ont également isolé à partir du Roquefort. D'après ces auteurs, la forte teneur en chlorure de sodium (15 à 20 g de NaCl p. 100 de la phase aqueuse de la surface du fromage) a une action favorable sur le développement des levures appartenant aux genres *Hansenula*, *Pichia* et *Debaryomyces*.

Des inconvénients peuvent résulter de la présence de certaines levures. D'après KISS et coll. (48) le bombement de boîtes de fromages blancs au cours du stockage en saumure, est provoqué par des levures fermentant le lactose en éthanol et gaz carbonique.

D'après le résultat que nous avons obtenu, nous ne pouvons pas confirmer avec certitude, l'absence des autres genres de levures, soit dans la saumure, soit dans le fromage. Car l'identification que nous avons faite, était sur un nombre limité de souches. De toute manière, nous pensons qu'il y a là un travail intéressant qui devra être poursuivi ultérieurement.

V - RESUME et CONCLUSION

L'évolution physicochimique, biochimique et microbiologique du fromage blanc affiné en saumure (à 15 et à 18 % de sel) a été suivie pendant une durée de 120 jours, à des températures de conservation de 5 à 20°C. Parallèlement à ces essais basés sur des techniques traditionnelles, l'emballage "Cryovac" qui représente certains avantages a été envisagé comme un nouveau mode de conservation du fromage blanc.

La diffusion du sel dans le fromage est rapide et importante, du fait d'une durée de saumurage prolongée, d'une surface relativement élevée et d'une teneur en eau dans le fromage frais assez importante.

Pour un taux d'humidité égal, la température et la concentration des saumures lorsqu'elles sont élevées, accélèrent la diffusion du sel et provoquent un fort drainage. Le fromage arrive à sa capacité maximale d'absorption du sel plus vite que ceux qui ont été conservés dans des saumures moins concentrées et à plus basses températures. Dans ce dernier cas, la diffusion du sel se poursuit régulièrement et finalement la teneur en sel du fromage est plus forte que dans le cas précédent ; mais la teneur en sel est toujours proportionnelle à l'humidité du fromage. Le fromage affiné en saumure subit au cours de la conservation une déminéralisation importante. Le rapport Ca/P dans ce type de fromage est un caractère spécifique.

L'évolution de l'acidité est différente de celle que l'on observe dans le fromage affiné en cave. Il y a un passage continu de l'acide lactique du fromage dans la saumure.

En ce qui concerne le contrôle d'affinage ; plusieurs méthodes ont été employées et discutées ; pour un contrôle rapide, la mesure de la densité optique à 274 nm du filtrat à pH 4,4 est satisfaisante. L'étude électrophorétique de l'affinage du fromage en saumure a montré que la dégradation de la caséine β est fortement inhibée par une teneur en sel très élevée. Par contre, les caséines γ_s et K ont subi une dégradation importante. L'électrophorèse sur gel d'amidon de la fraction azotée insoluble donne une image caractéristique de chaque type de fromage.

L'étude chromatographique des acides aminés libres du fromage par l'autoanalyseur "Technicon" a montré d'une part, que le fromage affiné en saumure en contient relativement peu et, d'autre part, que les proportions des acides aminés sont variables d'un fromage à l'autre.

Ce genre de fromage est caractérisé par un taux de maturation faible. La protéolyse est fortement ralentie par la forte teneur en sel ; par contre le fromage conservé sous film "Cryovac" et affiné à 10°C a un taux de maturation relativement élevé ; la période d'affinage est donc raccourcie.

La lipolyse n'a pas été freinée par le sel, son évolution se poursuit régulièrement dans les fromages affinés en saumure ; les lipases, contrairement aux protéases, ne sont pas très sensibles au sel. L'acidité lactique élevée dans le fromage "Cryovac" a un effet inhibiteur de l'hydrolyse de la matière grasse. Il faut ajouter que la température a une forte influence sur la lipolyse.

Le rendement diminue beaucoup quand la conservation du fromage est faite à température ambiante. Par contre, nous avons obtenu un gain de poids plus ou moins important quand la conservation a été faite à plus basse température, et surtout dans une saumure à 15 % de sel. En ce qui concerne la matière grasse, son évolution a suivi, au cours de la maturation, celle de l'extrait sec.

Après avoir tenu compte de nos résultats, concernant d'une part, l'effet de la concentration des saumures et de la température de conservation sur la diffusion du sel, l'affinage et le rendement et, d'autre part, les examens organoleptiques, nous recommandons la conservation dans une saumure à 15 % de sel et à basse température (5° ou 10°C).

La basse perméabilité à l'eau et aux gaz des films plastiques, leur résistance mécanique et leur résistance à l'acide lactique, font que l'emballage de type "Cryovac" est une méthode de conservation nouvelle à envisager. C'est une question à approfondir dans l'avenir en tenant compte de toutes les conditions climatiques et économiques locales qui interviennent sur la production de ce genre de fromage.

L'évolution chimique de la saumure a été étudiée pour une longue durée de conservation. La saumure s'enrichit fortement au cours de la conservation en calcium, phosphore, potassium, magnésium, acide lactique, matières azotées solubles et acides aminés libres. Nous constatons une relation très étroite entre la variation de la composition chimique de la saumure et celle du fromage.

L'aspect microbiologique a été également envisagé. La flore totale est constituée essentiellement, au début de la conservation de streptocoques lactiques. La flore lactique subit ensuite une destruction rapide et presque totale. Les levures se trouvent à la fin de la conservation en flore dominante. Les bactéries coliformes ne se développent pas dans ces conditions.

Neuf souches des levures halophiles ont été isolées à partir de la saumure ayant une concentration à 18 % de sel. 8 souches ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Debaryomyces hansenii*. Ces levures ne fermentent pas le lactose ; elles ne peuvent altérer le fromage et elles n'ont pas de signification hygiénique.

VI - BIBLIOGRAPHIE

1. ABDEL - SALAM (M. H.) and EL- SHIBINY (S.) (1972). - Changes in proteins of "Domiat" Cheese during pickling.
J. Dairy Res. , 39, 219.
2. ADES (G. L.) and CONE (J. F.) (1969). - Proteolytic activity of *Breimbacterium linens* during ripening of "Trappist" type cheese.
J. Dairy Sci. , 52, 957.
3. AGAGABYAN (A.), SAAKYAN (R.) et AMIRKHNYAN (R.) (1970). - Influence des oligo-éléments sur la maturation des fromages en saumures.
XVIIIe Congr. Int. de Laiterie, 1 F, 398.
4. ALI (L. A. M.) and MULDER (H.) (1961). - Taste and flavour forming compounds in cheese. The amino-acids content of Edam cheese.
The Netherlands milk and Dairy Journal, 15, 377.
5. ANON (1969). - Feta cheese : now it's made from Cow 's milk.
Abstr. : Dairy Sci. Abstracts, 31, 420.
6. ANTILA (V.) und ANTILA (M.) (1968). - Der Gehalt des finnischen Käses an freien amino säuren.
Milchwissenschaft, 23, 597.
7. ANTIPOVA (G.) (1966). - Effect of different salting procedures on cheese quality and yield.
Abstr. : Dairy Sci. Abstracts, 28, 12.
8. ASSENAT (L.) (1967). - Contribution à l'étude d'une méthode d'identification des laits et fromages au moyen de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
Lait, 47, 493.

9. A. O. A. C. Association of Official Agricultural Chemists (1965). - Official methods of analysis .
10em ed. Ass. Offici. Agr. Chemists. Washington,
D. C. P. 418 (29.006).
10. AZZA (A. I.) and HANSEN (K.) (1972). - Accumulation of free amino acids during cheese ripening of some type of Danish cheese.
Milchwissenschaft, 27, 556.
11. BAMMAN (E.), NOVOTNY (E.) et ROHR (L.) (1948). - Zur Colorimetrischer Bestimmung der Phosphorsäure (Einfluss der Säurekonzentration auf die Reduktion der Phosphormolybdänsäure durch Aminonaphthalsulfonsäure).
Chem. Ber. , 81, 438.
12. BEAU (M.) (1950). - Sur la maturation des fromages.
Lait, 30, 122.
13. BENDEK (G.) and SZAKALY (S.) (1972). - Changes in electrophoretic patterns of Emmental cheese during ripening caused by some technological modification.
Milchwissenschaft, 27, 236.
14. BREENE (W. M.), OLSON (N. F.) and PRICE (W. N.) (1965). - Salt absorption by Cheddar cheese curd.
J. Dairy Sci. , 48, 621.
15. BUSSON (F.), CARBIENER (R.) et LANZA (J.) (1960). - Methodes chromatographiques de dosage des acides aminés.
C. N. R. S. Paris.
16. CENTELEGHE (J. L.), MILLIERE (J. B.), WEILLET (L.) et WEBER (F.) (1971). - Aspects physico-chimiques et microbiologiques du salage en saumure des pâtes molles moisies (La Technique Laitière) du 10 juillet 1971.
17. CHINTESCU (G.) (1968). - Ripening and storage of Telemea cheese made with the incorporation of whey proteins.
Abst. : Dairy Sci. Abstracts, 30, 627.

18. CHKHAIDZE (D.) (1966). - Some peculiarities of Tushinsky cheese ripening.
XVIIe Congr. Int. de Laiterie, D : 1, 125.
19. CONSDE (R.), GORDON (A. H.) and MARTIN (A. J. P.) (1944). - Qualitative analysis of protein, a partition chromatography method using paper.
Biochem. J., 38, 224.
20. DAVIS (J. G.) (1965). - Cheese basic technology.
V. 1, 415 - 417. J. and A. Churchill LTD.
104, Gloucester Place, London, W. 1.
21. DEVOYOD (J. J.), BRET (G.) et AUCLAIR (J. E.) (1968). - La flore microbienne du fromage de Roquefort.
Lait, 48, 613.
22. DEVOYOD (J. J.) et SPONEM (D.) (1970). - La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures.
Lait, 50, 524.
23. DEMAN (J. C.), ROGOSA (M.) and SHARPE (M. E.) (1960). - A medium for the cultivation of Lactobacilli.
J. Appl. Bact., 23, 130.
24. DIFCO Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and chemical laboratory procedures. (1953).
Difco Labo - incorporated, Detroit, 1, Michigan, U. S. A.
25. DONGOC (M.), LENOIR (J.) et CHOISY (C.) (1971). - Les acides aminés libres des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin, Gruyère de Compté.
La Rev. Lait. franç., n° 288, 447.
26. EDWARDS (J. L.) and KOSIKOWSKY (F. V.) (1969). - Electrophoretic proteolytic patterns in Cheddar cheese by rennet and fungal rennets ; their significance to international classification of cheese varieties.
J. Dairy Sci., 52, 1675.

27. EFTHYMIU (C.) (1967). - Major free fatty acids of Feta cheese. -
J. Dairy Sci., 50, 20.
28. ELLIKER (P. A.), ANDERSON (A. M.) and HANNESSON (G.) (1956). -
Agar medium for lactic acid bacteria.
J. Dairy Sci., 39, 1611.
29. EL-SADEK (G. M.) et ABDEL-MOTTELEB (L.) (1958). - Effect of
the heat treatment of milk on the yield, quality, and
certain properties of standardized separated milk cheese.
J. Dairy Res., 25, 85.
30. EL-SADEK (G. M.) et ABDEL-MOTTELEB (L.) (1958). - The effect
of heat treatment and temperature of storage on the yield,
quality and chemical composition of karish cheese.
J. Dairy Res., 25, 480.
31. EL-SHIBINY (S.), ABDEL - SALAM (M. H.) and AHMED (N. S.) (1972)
The effect of formaldehyde used as a preservative of
milk on quality, yield and chemical composition of
Domiato cheese.
Milchwissenschaft, 27, 217.
32. F. I. L. Fédération Internationale de Laiterie (1967). - Norme n° 43
Détermination de la teneur en lactose du fromage et des
fromages fondus.
33. F. I. L. (1958) - Norme n° 4. Détermination de la matière sèche
du fromage et du fromage fondu.
34. FOX (F.) et WALLAY (B. F.) (1971). - Influence of sodium chloride
on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin.
J. Dairy Res., 38, 165.
35. GARNIER (M.) (1957). - Les produits laitiers du Liban et de la Syrie.
Etude biologique et vitaminologique.
Thèse en Pharmacie - Paris.

36. GHONIEM (N. A.) (1968). - Incidence of yeasts other than candida species in Domiati cheese.
Milchwissenschaft, 23, 482.
37. GORDON (W. G.) et Coll. (1949). - Amino acids composition of α - Casein and β Casein.
J. Am. Chem. Soc. , 71, 3293.
38. GOULD (I. A.) (1941). - J. Dairy Sci. , 24 779.
39. HAMDY (A.) (1970). - Utilisation de présure microbienne dans la fabrication du fromage "Domiati".
XVIII Congr. Int. de Laiterie, A. 4. 6, 358.
40. HARRIGAN (W. F.) and Mc CANCE (M. E.) (1966). - Laboratory methods in microbiology.
Academic Press. , London and New-York, p. 84.
41. JAKUBOWSKI (J.) und REPS (A.) (1964). - Beitrag zur Kenntnis des Salzabsorptionsvermögen von Käse.
Milchwissenschaft, 19, 413.
42. JAKUBOWSKI (J.) und REPS (A.) (1966). - Die durch Salz hervorgerufene Migration von Wasser und Mineralstoffen in Käse.
XVIIe Congr. Int. de Laiterie, D. , 365.
43. JAKUBOWSKI (J.) (1968). - Untersuchungen über die Kinetik der Diffusion von Salz in Käse.
Milchwissenschaft, 23, 282.
44. KEILLING (J.) . - "Le Gruyère" 20 mars 1934.
45. KERIMOV (G.) (1962). - Manufacture of white pickled cheese from ewe's milk.
Abst : J. Dairy Sci. Abstracts, 24, 98.
46. KERIMOV (G.) (1962). - Maintenance of optimal acidity in brine an important factor for improving the quality of brine cheeses.
XVIe Congr. Int. de Laiterie, V.B., 701.

47. KHORSHID (A. M.) and BHIMASENA (R. M.) (1971). - Accelerating the ripening of Domiati cheese.
Milchwissenschaft, 26, 472.
48. KISS (E.), EROSS (E.) und MARKUS (P.) (1966). - Über Bombag der weib Käse enthaltenden dosen.
XVIIe Congr. Int. de Laiterie, D : 1, 143.
49. KNUDSEN (S.) and OVERBY (A. J.) (1942). - Kong. vet. Ogland. Aarskr. Copenhagune.
50. KOSIKOWSKY (F. V.) (1951). - Paper partition chromatography of the free amino acids in american Cheddar cheese.
J. Dairy Sci. , 34, 228 .
51. KOSIKOWSKY (F. V.) (1951). - The liberation of free amino acids in raw and pasteurized milk Cheddar cheese, during ripening.
J. Dairy Sci. , 34, 235.
52. KUZDZAL - SAVOIE (S.) et KUZDZAL (W.) (1967). - Les acides gras libres du fromage.
Lait, 47, 9.
53. KUZDZAL - SAVOIE (S.) et MOCQUOT (G.) (1965). - Méthodes d'appréciation des caractères organo-leptiques des produits laitiers.
Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 19, 335. .
54. LACRAMPE (J. L.), HARDY (J.), RAMET (J. P.) et WEBER (F.) (1971). - Contribution à l'étude de l'évolution chimique et du traitement des saumures de fromagerie.
Le Lait, 51, 158.
55. LAMOTTE (M.) (1971). - Initiation aux méthodes statistiques en biologie. Editeurs : MASSON & Cie, Paris.
56. LEDFORD (R. A.), O'SULLIVAN (A. C.) et NATH (K. R.) (1966). - Residual casein fractions in ripened cheese determined by polyacrylamide. Gel electrophoresis.
J. Dairy Sci. , 49, 1098.

57. LENOIR (J.) (1963). - Note sur la composition en matières azotées des fromages.
Lait, 43, 500.
58. LINDEN (G.) (1971). - Applications de la spectrophotométrie d'absorption atomique dans les laboratoires d'industrie alimentaire.
Industrie Alimentaire Agr., 88, 793.
59. LINDEN (G.), GOHIER (B.), ALAIS (C.) et TARODO de la FUENTE (1970). - Essais de dessalification des produits laitiers par électrodialyse.
Lait, 50, 511.
60. LING (E. R.) (1956). - A textbook of dairy chemistry.
London, Chapman et Hall LTD, 2, 131.
61. LING (E. R.) (1956). - A textbook of Dairy Chemistry.
London, Chapman et Hall LTD, 1, 193.
62. LODDER (J.) and KREEGER van RIJ (N. J. W.) (1952). - The Yeasts. A taxonomic study.
North Holland publishing Company, Amesterdam.
63. MANOLKIDIS (C.), POLYCHRONIADOU (A.) et ALICHNIDIS (E.) (1970). - Variation dans la composition du fromage "Téléme".
Lait, 50, 38.
64. MANSOUR (A. H.) (1967). - Les problèmes pastoraux et humains dans les zones arides du Moyen-Orient.
J. d'Agric. Tropical et de Botanique appliquée, 14, 444.
65. MANSOUR (A.) (1971). - L'industrie laitière en Syrie.
Revue Laitière Franç., n° 286, 295.
66. MANSOUR (A.) et ALAIS (C.) (1971). - Le mécanisme du salage des fromages en saumure.
Revue Laitière Franç., n° 290, 641.

67. MANSOUR (A.) et ALAIS (C.) (1972). - Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. Aspect biochimique : Evolution de la composition du fromage et rendement. Lait, 52, 515.
68. MANSOUR (A.) et ALAIS (C.) (1972). - Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. II - Evolution chimique de la saumure. Lait, 52 (sous presse).
69. MEL'NIK (E.) (1963). - Accelerating the ripening of pickled cheese. Abst. J. Dairy Sci. Abstracts, 25, 271.
70. MICKELSEN (R.) and NANCY (L. F.) (1970). - Comparing proteolytic action of milk - clotting enzymes on caseins and cheese. J. Dairy Sci., 53, 704.
71. MORR (C. V.) (1971). - Comparison of protein preparation procedure and starch versus polyacrylamide gel electrophoresis for examining casein degradation products in cheese. J. Dairy Sci., 54, 39.
72. MOORE (S.) and STEIN (W. H.) (1954). - J. Biol. Chem., 211, 893.
73. NEY (K. H.), WIROTAMA (I. P. G.) and SEITZ (I.) (1966). - Die Untersuchung von Käse mittels polyacrylamid gel electrophorese. XVIIe Congr. Int. de Laiterie, D, 283.
74. NILSON (K. M.) (1969). - Solving problems of Mozzarella cheese. Abstr : Dairy Sci. Abstracts, 31, 552.
75. PENEV (P.) et PRODANSKI (P.) (1966). - Préparation d'un nouveau type de fromage blanc saumuré par incorporation de protéines de lactosérum sans pasteurisation élevée du lait. XVIIe Congr. Int. de Laiterie, D : 1, 149.

76. RANDOIN (L.) et JOURDAN (C.) (1952). - Vue d'ensemble sur les valeurs calcio-phosphoriques de 23 variétés de fromages Lait, 32, 607.
77. RITTER (W.), SCHILT (P.) and LOWE (A.) (1966). - Untersuchungen über die Entwicklung von Peptiden und Aminosäuren in Käse.
XVIIe Congr. Int. de Laiterie, D, 269.
78. SCHAEFFER (A. B.) et Mc D. FULTON (1933). - Science, 77, 194.
79. SERRES (L.), AMARIGLIO (S.) et PETRANSXIENE (D.) . -
Contrôle de la qualité des produits laitiers. Analyse microbiologique et analyse sensorielle.
Tome 2, Ministère de l'Agriculture, service vétérinaire.
80. SHARARA (H. A.) (1959). - Study of the chemical changes occuring in "Domiat" cheese during pickling.
Astr. : J. Dairy Sci. Abstracts, 22, 103.
81. SHLICHEV (Y.) et GORANOV (V.) (1970). - Quelques aspects technologiques de la mécanisation de la fabrication de fromage blanc en saumure.
XVIIIe Congr. Int. de Laiterie, A. U. 6, 357.
82. SIRRY (I.) et KOSIKOWSKI (F. V.) (1959). - Pasteurization and hydrogen peroxyde treatment of milk for egyptian "Domia"
XVe Congr. Int. de Laiterie, 2, 812.
83. SODEMOGENSEN (M. T.) (1947). - Medd. Statens. Mejeriforsök, 21.
84. STADHOUDERS (J. J.) (1956). - The hydrolysis of cheese fat in relation to the flavour of cheese.
Abstr. : Dairy Sci. Abstracts, 19, 592.
85. STADHOUDERS (J.) (1959). - Thermoresistance des lipases lors de la fabrication du fromage.
XVe Congr. Int. de Laiterie, 2, 709.

86. STADHOUDERS (J.) and MULDER (H.) (1957). - Fat hydrolysis and cheese flavour. I - The enzymes responsible for the hydrolysis of fat in cheese.
The Netherlands milk and Dairy J., 11, 164.
87. TURK (S.) (1972). - Etude biochimique de la coagulation acide du lait concentré.
Thèse, Nancy.
88. VAKALERIS (D. G.) et PRICE (W. V.) (1959). - A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening.
J. Dairy Sci., 42, 264.
89. VIARD (M.) et DEVEAU (J.) (1972). - Epuration chimique et stérilisation microbiologique par traitement des saumures utilisées dans l'industrie alimentaire et en particulier dans l'industrie fromagère.
Lait, 52, 21.
90. VUJICIC (I.) (1963). - A study on the relation ship between the factors influencing the time of cheese salting.
Milchwissenschaft, 18, 282.
91. WAKE (R. G.) and BALDWIN (R. L.) (1961). - Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea.
Biochim. Biophys. Acta, 47, 225.
92. WICKERHAM (L. J.) and DUPART (E.) (1945). - A remarkable fission yeast, *saccharomyces versatilis*.
J. Bact., 50, 363.
93. WICKERHAM (L. J.) and BURTON (K. A.) (1948). - Carbon assimilation tests for the classification of yeasts.
J. Bact., 56, 363.
94. WICKERHAM (L. J.) (1951). - Tech. Bull. N° 1029, U. S. Dept. Agric., Washington, D. C.
95. WILLART (S.) and SJOSTROM (G.) (1959). - The influence of sodium chloride upon the hydrolysis of milk fat in milk and cheese.
XVe Congr. Int. de Laiterie, 3, 1481.

96. ZIVKOVIC (Z.) (1964). - Chemical changes in brine during the ripening of soft white cheese.
Abstr. : J. Dairy Sci. Abstracts, 26, 287.
97. ZONJI (D. J.) (1971). - Beitrag zur problematik des salzens von Kase im salzbad.
Milchwissenschaft, 26, 745.

---o0o---

